

PORTO CONTE RICERCHE

Progetto

GREEN CHEMISTRY: Molecole bioattive da biomasse

RELAZIONE FINALE

PROGETTO CLUSTER "GREEN CHEMISTRY"

La Green Chemistry (chimica verde o chimica sostenibile) indica la chimica per l'ambiente. Essa è fondamentalmente una filosofia il cui scopo è quello di prevenire l'inquinamento, riducendo o eliminando l'uso di prodotti e/o processi pericolosi, sostituendoli con altri ecocompatibili.

La Green Chemistry nasce negli anni novanta, negli U.S.A., a fronte dell'inutilità di leggi emesse a posteriori per combattere l'inquinamento, la cui attuazione risulta oltretutto onerosa. Tra queste si ricordano ad esempio il "Clean Air Act", emessa agli inizi degli anni '70, o quella denominata "Toxic Substances Control Act " (TSCA), promulgata nel '76.

La prima legge che affronta il problema della prevenzione dell'inquinamento nei processi produttivi, è il Pollution Prevention Act del 1990, mentre nel 1991 l'Environment Protection Agency (EPA) inizia a focalizzarsi sulla Green Chemistry.

Tuttavia bisogna aspettare la fine degli anni '90 (1998) perché venga accolta una proposta dell'EPA, con l'istituzione all'interno dell'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) un Comitato Guida per le attività della chimica sostenibile.

I dodici principi della Green Chemistry sono stati sviluppati da Anastas, Warner e John e vengono utilizzati per valutare quanto "green" possa essere una sostanza chimica, una reazione o un processo.

L'intento della green chemistry può essere realizzato attraverso:

- l'ottimizzazione del bilancio di massa globale così da minimizzare i reflui;
- la minimizzazione dei costi energetici, e l'utilizzo di materie primarie ricavate da fonti rinnovabili;
- la sostituzione di composti obsoleti con altri che mantengano la loro efficacia funzionale riducendo nel contempo la tossicità nei confronti dell'uomo e dell'ambiente.

Ciò che è la sintesi dei "dodici principi della Green Chemistry" e che rappresentano il vero manifesto della chimica ecosostenibile. Alcuni di questi principi possono essere perseguiti attraverso l'ottenimento di molecole da prodotti alternativi (es. da biomasse derivanti da scarti di lavorazione, o da piante spontanee) e con processi estrattivi di molecole alternativi (es. con fluidi supercritici).

Le biomasse di scarto, che residuano al termine di un determinato processo produttivo, sono una grande risorsa che se non riutilizzata può risultare un costo (per lo smaltimento) per l'industria che la produce, oltre che un problema in termini ambientali.

A solo titolo di esempio si può ricordare ciò che l'industria vegetale o l'agricoltura in genere (melasse da zuccherifici, scotta da caseifici, residui vegetali da produzioni agricole, etc) può mediamente riversare nell'ambiente, e quali costi essi sottintendano all'impresa, e a tutta la comunità.

Altre biomasse, rappresentate da piante spontanee, non necessitando per la loro produzione di nessun tipo di pratica agricola, sono una fonte di molecole attive sia a basso costo che impatto ambientale.

Aziende partecipanti

In seguito al bando hanno manifestato interesse a partecipare al progetto le seguenti imprese

N.	Impresa	Attività	Sede
1	Cantina Santa Maria La Palma	Vini e distillati	S.M. La Palma
2	Biofarmitalia S.p.A.	Cosmetic & Drug Delivery	Pula
3	Agrologudoro coop agricola a r.l.	Mangimi	Ozieri
4	Copar - Cooperativa olivicoltori Parteolla	Olive da mensa e olio	Dolianova
5	Consorzio Officinerbe Sardinia	Piante aromatiche e officinali e loro derivati (Osidda
6	Nutriseach s.r.l.	sostanze nutrizionali bioattive naturali	Pula
7	Methab s.r.l.	Chimica e biologia degli alimenti destinati all'uomo e agli animali sportivi e della cosmesi	Alghero

E i seguenti centri di ricerca/dipartimenti universitari

Centri di ricerca partecipanti:

N.	Centro di ricerca	Attività	Sede
1	Dipartimento Scienze del Farmaco		Sassari
2	Dipartimento Scienze Chimiche	estrazione con FS di olii essenziali coloranti, scarti agroindustria	Cagliari
3	Co.SME.Se. - Consorzio per lo studio dei Metabolici Secondari	Ricerca sui metaboliti secondari di origine naturale vegetale	Cagliari
4	CNR Istituto chimica biomolecolare		Sassari
5	Dipartimento di scienze biomediche	Attività biologica estratti	Sassari

Da segnalare che, la società METHAB s.r.l. ed Agrologudoro non hanno mai preso parte a nessuno degli incontri organizzati, sia per la definizione delle strategie che per le comunicazioni sullo stato di avanzamento del progetto. Si segnala, inoltre, l'assenza alle attività progettuali sia dell'Istituto di chimica biomolecolare (CNR), che del Dipartimento di Scienze del Farmaco (Università degli Studi di Sassari).

Principali linee di attività previste:

Obiettivi

Le imprese partecipanti al progetto hanno manifestato l'esigenza di approfondire le conoscenze sui sistemi estrattivi più in linea con i principi della Green Chemistry, con l'obiettivo finale di ottenere molecole attive con tecniche estrattive innovative.

L'obiettivo è stato perseguito attraverso:

- ✓ L'approvvigionamento delle matrici oggetto di studio
- ✓ la messa a punto dei protocolli dei processi di estrazione
- ✓ l'individuazione di molecole o di classi molecolari, da utilizzarsi in campo farmaceutico e/o alimentare come integratori.

Nello specifico l'attenzione è stata rivolta verso biomasse potenzialmente ricche di quelle sostanze chimiche (antiossidanti, coloranti, polisaccaridi, ecc.) e/o le miscele di composti (oli essenziali) di sicuro interesse farmacologico, o da utilizzare come integratori.

Le matrici sono state individuate previamente all'inizio delle attività e di concerto con le imprese e gli enti coinvolti nel progetto. Tuttavia in corso d'opera verificata l'indisponibilità della matrice Timo (*Thymus herbarona*), la stessa, in accordo con i partner di progetto, è stata sostituita con *Helicrisum spp.*

In sintesi, l'attività progettuale ha riguardato le seguenti matrici:

- ✓ Lentisco (*Pistacia lentiscus*) (sia foglie che bacche),
- ✓ Salvia (*Salvia desoleana*) ed
- ✓ Elicriso (*Helicrisum spp.*).
- ✓ Vinacce di uve *Cagnulari* (anni 2007 e 2008)
- ✓ Sanse esauste da industria olearia provenienti da *cultivars* diverse (anni 2007 e 2008)

RICERCA BIBLIOGRAFICA

Prioritariamente alla fase sperimentale è stata condotta una approfondita ricerca bibliografica, per individuarne le caratteristiche compositive specifiche e gli eventuali principi attivi di particolare interesse sui quali indirizzare le successive attività.

Stato dell'arte Matrice "Vinacce"

La vinaccia è quanto rimane dalla pressatura in cantina dell'uva fresca o ammostata ed è costituita da buccia, polpa, vinaccioli e raspi.

Tale vinaccia di cantina (detta anche vinaccia vergine), per disposizione comunitaria deve essere conferita alle distillerie per la produzione di alcool etilico oppure può essere destinata in parte alla produzione di grappe. I raspi e i vinaccioli non vengono utilizzati per la distillazione.

Va sottolineato, al riguardo, che a livello comunitario esistono surplus di alcool e problemi connessi al loro stoccaggio.

Indicativamente per 100 Kg di uva si ottengono 80-85 Kg di mosto, 9-10 Kg di vinaccia (intesa come buccia) 3-4 Kg di raspi e 3-4 Kg di vinaccioli. Il valore commerciale della vinaccia dipende dalla umidità, dalla presenza o meno di raspi e dalla quantità di zucchero e alcool. L'umidità dipende dalla sovrappressatura che si è effettuata sulle vinacce; per cui se essa è stata intensa si ha una perdita di qualità del prodotto a causa di un minor contenuto di zuccheri e quindi di alcool. Per quanto riguarda i raspi essi sono poco graditi poiché cedono alla grappa sostanze indesiderate.

I costituenti della vinaccia variano in quantità e composizione chimica a seconda che la vinaccia sia fresca oppure abbia subito insilamento. Durante la conservazione infatti possono avvenire processi chimici e microbiologici che ne odificano alcuni costituenti.

I composti chimici che costituiscono la vinaccia sono più numerosi di quelli del vino. I composti chimici che possono volatilizzare passano nel distillato, gli altri vanno a costituire la vinaccia esausta che normalmente viene utilizzata come combustibile nella stessa distilleria o potrebbe essere impiegata nella preparazione di mangimi, per l'estrazione dell'olio di vinaccioli etc.. La composizione generale della vinaccia al termine dell'insilamento è la seguente:

- acqua,
- alcool (soprattutto alcool etilico e metilico) glicerina e alcool superiori (propilico, butilico etc.);
- acidi: sono principalmente acidi organici distinti in due categorie, acidi volatili che con la distillazione passano nella grappa (acetico, propionico, butirrico, etc.) e gli acidi fissi che non si ritroveranno più nella grappa ma restano nella vinaccia esausta;
- aldeidi: acetica, isovalerianica, propionica, butirrica etc.

- esteri: acetato di etile, lattato di etile, propionato, isobutirrato, capronato, caprillato, isovalerianato di etile, acetato di isoamile etc.;
- componenti aromatici;
- polifenoli: antociani (sostanze coloranti dei vini rossi), flavani e flavonoli (sostanze coloranti dei vini bianchi), acidi fenolici e tannini;
- proteine;
- cellulosa;
- pectine;
- sali minerali;
- residui di zuccheri.

Tra i componenti aromatici particolare menzione può essere data al resveratrolo (trans 3,4',5 triidrossistilbene) che è una fitoalessina presente nell'uva, nel vino e in determinate altre piante. Dato che è presente nella buccia e non nella polpa il vino bianco contiene quantità di resveratrolo molto più basse del vino rosso. Le concentrazioni di resveratrolo nelle forme trans e cis isomeri di agliconi e glucosidi sono soggette a numerose variabili. Nelle bucce dell'uva rossa le concentrazioni del trans isomero, che è la forma principale, generalmente variano da 10 a 30 mg/Kg di uva. Come composto fenolico il resveratrolo contribuisce al potenziale ossidante del vino rosso e può giocare un importante ruolo assieme a catechine, procianidine e flavonoli nella prevenzione delle malattie cardiovascolari.

E' stato dimostrato che il resveratrolo modula il metabolismo dei lipidi e delle LDL (lipoproteine a bassa densità) e l'aggregazione delle piastrine. Inoltre, il resveratrolo, in recenti studi ha dimostrato attività fitoestrogenica. Questo composto possiede inoltre attività antiinfiammatorie e antitumorali. Recentemente, è stato anche dimostrato che il resveratrolo aumenta sinergicamente l'attività anti-HIV-1 degli analoghi nucleosidi come la zidovudina, la zalcitabina e la didanosina. A loro volta i fenoli procianidinici, i flavonoli e gli acidi fenolici (in particolare i derivati dell'acido caffeico), presentano attività antiossidante, antiinfiammatoria ed antimicrobica, oltre che essere, secondo recenti studi, potenti inibitori di alcune forme tumorali. Sulla base di questi dati è possibile identificare il resveratrolo, i flavonoidi ed i polifenoli in generale come importanti componenti della vinaccia esausta che può essere considerata una importante fonte di estratti ad uso farmaceutico, cosmetico e di integrazione alimentare.

Il recupero dei fenoli dalle vinacce può essere quindi un obiettivo di grande interesse industriale al fine di produrre dei nutraceutici ad alto valore aggiunto.

L'azienda cooperativa S.M. La Palma, ha proposto quale matrice da sottoporre a valorizzazione tramite tecnologie *green*, le vinacce esauste di uve di *Cagnulari* lavorate per l'ottenimento di vini rossi.

La bibliografia consultata (e riportata in calce), ha evidenziato come nel corso degli anni, l'attenzione degli studiosi si sia rivolta in maniera particolare, verso la dotazione polifenolica della materia prima, ed anche sulla possibilità di estrarre da vinacce e vinaccioli alcuni prodotti bioattivi ad alto valore aggiunto (polifenoli, ecc.) attraverso approcci innovativi ecocompatibili quali la CO₂ supercritica.

Come obiettivi strategici si considerano, l'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica, coerentemente con le professionalità presenti all'interno del cluster.

Stato dell'arte LENTISCO

Il lentisco o lentischio (*Pistacia lentiscus* L.), appartiene alla famiglia delle Anacardiaceae ed è un arbusto legnoso sempreverde, molto ramificato, che può raggiungere i 3-4 metri di altezza. Le foglie sono paripennate con 8-10 segmenti lanceolati a margine intero, i fiori rosso-bruni o gialli (il periodo di fioritura è marzo-aprile) e le drupe subsferiche (4 mm), prima rosse e poi nere al raggiungimento della maturità, vengono prodotte dalla fine dell'estate all'autunno. Tra gli arbusti diffusi nell'ambiente dai i vertebrati è uno dei più comuni nel bacino Mediterraneo (dal livello del mare fino a 700 m di altitudine) e la sua capacità di germogliare dopo gli incendi e di proteggere il suolo dall'erosione ne fanno una pianta particolarmente interessante nei programmi di riforestazione [1,2].

In Sardegna, probabilmente sin dall'età nuragica, dalle bacche in piena maturità si ricava un olio che soprattutto in passato veniva utilizzato per vari scopi (grezzo per l'illuminazione domestica e depurato per uso alimentare e cosmetico). La medicina popolare ha inoltre da sempre riconosciuto le proprietà astringenti delle foglie (dovute al loro elevato contenuto di tannini) che venivano utilizzate contro l'ipersudorazione, le irritazioni e i dolori reumatici. L'infuso veniva spesso utilizzato come collutorio [3]. Recentemente, sono stati dimostrati sia l'effetto epatoprotettivo di estratti acquosi di foglie di lentisco in vivo [4] che il loro effetto epatotossico [5].

Dalle foglie di lentisco è possibile ricavare, seppure con rese molto basse (tra 0,02% e 0,45%), un olio essenziale dotato di attività antimicrobica, antifungina e antiossidante [6-9], la cui composizione varia a seconda della zona geografica di provenienza e del metodo di estrazione utilizzato [7,10-12].

Stato dell'arte Matrice "Sansa"

Uno dei maggiori problemi ambientali nei Paesi Mediterranei (Spagna, Italia, Grecia, Portogallo, Libano, Turchia, Tunisia, Siria) è rappresentato dallo smaltimento dei reflui provenienti dai processi di produzione dell'olio d'oliva rappresentati da una matrice liquida (le acque di vegetazione) ed una solida (le sanse).

Nell'area Mediterranea è concentrata infatti più del 95% della produzione olearia mondiale, e quasi 30 milioni di m³ di residui solidi e liquidi vengono prodotti ogni anno; le acque di vegetazione, nonostante l'assenza di

elementi patogeni, sono caratterizzate da un eccessivo contenuto in polifenoli, la cui biodegradabilità è bassa, e da un contenuto organico di due ordini di grandezza più elevato di quello delle acque di scarico domestiche (COD $150 \geq$ g/l), che, associato ad una produzione concentrata nel tempo e nello spazio, ne fa una sostanza potenzialmente dannosa per l'ambiente; i trattamenti disponibili, se pur molto efficienti (abbattimento del carico organico fra il 65 e il 95%), risultano troppo costosi per le realtà produttive di piccola scala, che sono la maggioranza nel settore oleario.

Nella classica filiera di produzione dell'olio d'oliva, la sansa vergine prodotta dai frantoi è "materia prima secondaria" per i sansifici che estraggono chimicamente (con esano) l'olio in essa residuo. La sansa esausta conosce svariate destinazioni tra cui prevale l'utilizzo energetico come combustibile (PCI = 3500-4000 kcal/kg). Il completo riutilizzo dei residui chiude così l'intero ciclo di produzione.

La continuità della filiera è stata interrotta con l'introduzione negli anni '90 degli estrattori centrifughi a due fasi che producono una sansa con un tasso di umidità più elevato (circa 65%) perché contenente anche le acque di vegetazione, di cui viene drasticamente ridotto il problema di smaltimento, con grandi vantaggi economici e ambientali. Tuttavia è richiesta al sansificio una fase di essiccazione più impegnativa, con costi maggiori per l'estrazione chimica dell'olio residuo. I maggiori costi nella trasformazione seconda, e una crisi di mercato dell'olio di sansa hanno spinto i frantoiani a ricercare nuove forme di collocazione del sottoprodotto (o di materia seconda).

L'indicazione della sansa quale matrice di interesse da parte di una delle imprese partecipanti al progetto "Green Chemistry" è la conferma di una accresciuta sensibilità da parte del sistema produttivo nei confronti di questa problematica.

Il principio seguito nella ricerca bibliografica sull'argomento, è stato quella di verificare lo stato dell'arte sullo smaltimento degli scarti di lavorazione dell'industria olearia, monitorando i progressi compiuti nel corso degli anni a riguardo la valorizzazione delle sanse di olive.

Allo stesso tempo è stata individuata una molecola sicuramente presente in tale matrice che fosse possibile estrarre con una tecnologia *green* e quindi coerentemente con i principi del progetto.

In seguito ad un incontro con le parti coinvolte nel progetto, è stata individuata quale molecola di sicuro interesse lo squalene. Chimicamente può essere definito come *"un triterpene presente nell'olio di fegato degli squali ma anche nei vegetali come i semi di amaranto, crusca di riso, germe di grano e olive"*.

È riconosciuta alla classe dei composti triterpenici, diverse funzioni nei processi fisiologici degli eucarioti, che sono allo stato attuale in fase di studio.

Tuttavia ad essi vengono attribuiti allo stato attuale delle conoscenze, alcuni benefici effetti tra ai i quali:

- azione antidolorifica ed antinfiammatoria
- coadiuvante in alcune disfunzioni dell'apparato respiratorio;

- attività coadiuvante di alcune sindromi influenzali;
- azione coadiuvante nel mantenimento del sistema scheletrico e circolatorio;
- potenziante delle masse muscolari;
- coadiuvante nella terapia della cartilagine ricostruita dopo interventi chirurgici;
- azione catalizzatrice nella preparazione di alcuni tipi di vaccini, e soprattutto, date le proprietà antiossidanti, nella loro stabilizzazione.

L'importanza intrinseca di tale molecola *target*, combinata alla possibilità di essere ottenuta attraverso metodiche *green*, è supportata dalla bibliografia consultata.

Stato della arte matrice “TIMO ERBA-BARONA”

Il timo erba-barona (*Thymus Herba-barona* Loisel.), appartenente alla famiglia delle Labiateae, è un endemismo sardo-corso, molto diffuso sui monti della Sardegna a partire dai 700 m sul livello del mare. È un arbusto nano strisciante, legnoso, alto 10-20 cm con foglie lineari lanceolate fortemente aromatiche, dalle quali si ricava un olio essenziale con note proprietà antisettiche, antinfiammatorie, balsamiche, espettoranti, digestive, antalgiche [1,2,5]. Ne è stata inoltre dimostrata l'efficacia come insetticida [3]. In Sardegna sono stati identificati due chemiotipi, caratterizzati rispettivamente dalla prevalenza di timolo e di carvacrolo in alta percentuale [4]. Nella tradizione popolare i rametti fogliati vengono utilizzati per aromatizzare i cibi, in particolare gli arrostiti. In campo cosmetico il decotto viene impiegato contro la forfora e per rinforzare i capelli [5]

Stato dell'arte Matrice “*Salvia desoleana*”

Da un punto di vista botanico è un frutice sempreverde con portamento vigoroso, alta anche fino a quasi 2 metri, rivestita da una fitta peluria. I fusti hanno una sezione tetragonale. I fusti di più anni sono lignificati, spessi da 1 a 4 cm, prostrato-ascendenti. Quelli dell'anno sono eretti. L'intera pianta, ma in particolare le foglie, emana un forte aroma pungente.

Le foglie sono semplici ed opposte, picciolate, feltrose al tatto. La lamina è ovata con seno peziolare cordato, molto espansa con una lunghezza che varia dai 5 ai 20 cm. Il margine è irregolarmente ondulato e crenato. La pagina superiore è bollosa e verde glauca. La pagina inferiore mostra nervature molto pronunciate.

I fiori sono riuniti a verticilli in spicacstri terminali ramificati, lunghi 30-40 cm. La corolla è bilabiata, lunga 2-3 cm, di colore variabile dal bianco al roseo, con lobo superiore marcatamente arcuato. Il calice è campanulato, lungo poco più di 1 cm, terminante con cinque lobi acuti.

Il frutto è un achenio racchiuso dal calice persistente.

Fiorisce in tarda primavera fino all'estate inoltrata, ma spesso rifiorisce all'inizio dell'autunno (1).

L'interesse della salvia di Desole, per l'affinità con la *Salvia sclarea*(1, 2, 3, 4, 5), è indirizzato principalmente ai potenziali impieghi dell'olio essenziale nel settore chimico-farmaceutico e in quello della profumeria. L'olio essenziale di questa specie, molto affine geneticamente alla *Salvia sclarea*, contiene gli stessi principi attivi: linalolo, acetato di linalile e, in tracce, sclareolo. Alcune informazioni segnalano una resa più elevata in olio essenziale, presumibilmente in virtù della maggiore intensità dell'aroma emanato dalla *Salvia desoleana* (1). In alcuni paesi si beve il decotto concentrato di foglia nella diarrea (6).

Fra gli studi effettuati sull'olio essenziale della salvia di Desole e riportati nella letteratura si citano la composizione e la distribuzione nella pianta, la possibile applicazione come componente di farmaci in odontostomatologia (presumibilmente come antiinfiammatorio e blando antisettico), la possibile applicazione in tecniche di lotta biologica contro la Varroa. Altri studi riguardano invece la potenzialità di sviluppo di una filiera di coltivazione e trasformazione e la moltiplicazione con tecniche di micropropagazione (1).

Altri impieghi ipotizzati sono nell'industria dei liquori (1).

PREPARAZIONE MATRICI

Vinacce da Cagnulari

In corrispondenza con la maturazione di trasformazione delle uve del vitigno Cagnulari, queste sono state vinificate presso la cantina cooperativa S. Maria La Palma (Alghero). Due q.li delle vinacce esauste provenienti dalla trasformazione, sono state immediatamente conferite presso la Porto Conte Ricerche S.r.l., per essere sottoposte ad essiccazione.

Presso tale sede, un'aliquota omogenea della massa, è stata congelata al fine di essere utilizzata quale riferimento alla matrice "fresca". La restante parte della massa, è stata sottoposta ad essiccazione in apposito essiccatore ad armadio, al fine di ottenere le condizioni di umidità ottimali per la conservazione e successiva estrazione in CO₂ supercritica (circa 10%). Al fine di limitare la degradazione dei principi attivi contenuti, la temperatura di esercizio nell'essiccatore è stata mantenuta inferiore a 35 °C.

Al termine della fase di essiccazione, la matrice è stata confezionata sottovuoto in buste di materiale plastico ad alta barriera, e stoccate in cella fredda a 5 °C. Una quota del materiale "fresco" ed essiccato è stato inviato presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell' Università degli studi di Cagliari (responsabile Prof. Bruno Marongiu).

Pistacia lentiscus

Circa 200 kg di rametti di lentisco sono stati raccolti e conferiti nella stessa giornata dal Consorzio Officinerbe Sardinia alla sede della Porto Conte Ricerche, dove si è immediatamente provveduto alla attuazione della fase di essiccazione in corrente d'aria fino al raggiungimento di una umidità di circa il 10% in peso. Al fine di limitare la degradazione dei principi attivi contenuti, la temperatura di esercizio nell'essiccatore ad armadio è stata mantenuta intorno ai 35 °C. I rametti essiccati sono stati sfogliati manualmente e le foglie sono state imbustate sottovuoto in buste di materiale plastico "alta barriera" e conservate in cella frigorifera a 5 °C. Prima dell'essiccazione, una aliquota omogenea della massa conferita è stata prelevata e conservata a -30°C. Le foglie fresche sono state sottoposte ad analisi per determinarne il grado di umidità iniziale.

Sansa di oliva

Durante la campagna di produzione di olio d'oliva circa 200 kg di sansa, derivante da un processo di trasformazione a tre fasi, sono stati conferiti dalla impresa Copar - Cooperativa olivicoltori Parteolla alla Porto Conte Ricerche. Le sanse sono state analizzate per determinarne il grado di umidità e sottoposte alla fase di essiccazione in corrente d'aria fino al raggiungimento di una umidità di circa il 7% in peso. Al fine di limitare la degradazione dei principi attivi contenuti, la temperatura di esercizio nell'essiccatore ad armadio è stata mantenuta intorno ai 35 °C. La sansa essiccata è stata in parte confezionata sottovuoto in buste di materiale plastico ad alta barriera ed in parte disposta in fusti di plastica a chiusura ermetica. Entrambe le aliquote sono state stoccate in cella frigorifera a 5 °C. Prima dell'essiccazione, una parte omogenea della massa conferita è stata prelevata e conservata a -30°C. Una quota del materiale congelato e una quota di quello essiccato sono stati inviati presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell' Università degli studi di Cagliari (responsabile Prof. Bruno Marongiu).

ATTIVITÀ ESTRATTIVA, ANALITICA E BIOLOGICA

Di seguito vengono riportate, nel dettaglio, le attività che hanno riguardato le singole matrici, riguardo alle caratteristiche chimico-fisiche sia pre-estrattive che degli estratti. Per questi ultimi, laddove presenti, vengono riportati i risultati relativi all'attività biologica.

Attività analitica

Obiettivi principali dell'attività analitica che ha riguardato le singole matrici sono stati:

- l'individuazione di molecole o classi molecolari di particolare interesse biologico;
- la caratterizzazione delle matrici;
- la caratterizzazione chimico-fisica degli estratti.
- la valutazione dell'attività biologica

Tutte le matrici prima di essere sottoposte al trattamento di estrazione, differente in base alla loro natura, sono state opportunamente essiccate fino ad una umidità tra il 5 e 10%. (Tab.1)

Matrice	Fornitore	Umidità iniziale (%)	Temperatura di essiccazione (°C)	Umidità finale (%)
Sansa 2007	Copar	52,48	35	5,60
Sansa 2008	Copar	75,97	35	6,00
Vinacce Cagnulari 2007	Santa Maria La Palma	52,58	35	5,76
Vinacce Cagnulari 2008	Santa Maria La Palma	52,58	35	5,76
Lentisco foglie	Cons.Officinerbe Sardegna	49,25	35	9,45
Bacche di Lentisco	Cons.Officinerbe Sardegna	48,34	35	7,88
Salvia	Cons.Officinerbe Sardegna	64,51	35	11,13
Elicriso	Cons.Officinerbe Sardegna	52,57	35	7,76

Tab. 1: schema riassuntivo delle matrici e delle loro caratteristiche dopo il conferimento.



Fig. 1 Matrici deumidificate e aliquotate in film plastico.

Si riportano di seguito, per ogni singola matrice, i materiali e metodi utilizzati per il raggiungimento degli obiettivi, i diversi approcci sperimentali intrapresi e i risultati ottenuti.

Vinacce Cagnulari

Le vinacce esauste sono state reperite presso la cantina S.M. La Palma subito dopo il termine della fase di macerazione e trasportate presso i laboratori di P.C.R per la successiva fase di deumidificazione. Sono state messe a disposizione, per le attività analitiche, quelle relative alle campagne vendemmiali degli anni 2007 e 2008.



Fig. 2: Vinacce preparate per la deumidificazione.

In base all'analisi bibliografica iniziale l'attenzione è stata focalizzata principalmente sull'estrazione e determinazione selettiva della famiglia degli antociani.

Analisi della matrice

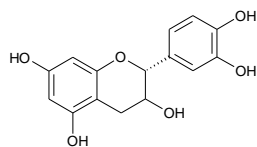
Un particolare interesse, da parte della comunità scientifica, è rivolto ad alcuni flavonoidi (catechine ed epicatechine e i loro derivati gallati) e agli stilbeni (resveratrolo e derivati glicosilati), presenti entrambi in *Vitis vinifera*.

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato che catechine e resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene), oltre a possedere elevata attività antiossidante, presentano interessanti proprietà chemiopreventive e antiproliferative nei confronti di diverse forme neoplastiche. In particolare, le epigallocatechine (EGC), le epicatechine gallate (ECG), e le epigallocatechine gallate (EGCG) inibiscono, in vitro, la proliferazione di cellule

umane dei tumori della mammella e del colon, e riducono lo sviluppo del tumore mammario nei roditori. Rispetto alle altre catechine, le EGCG e le EGC presentano una più elevata attività antiproliferativa.

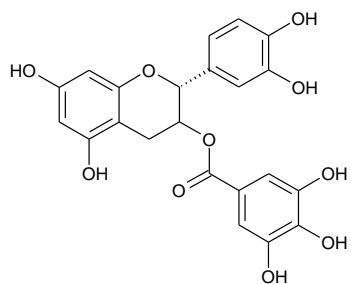
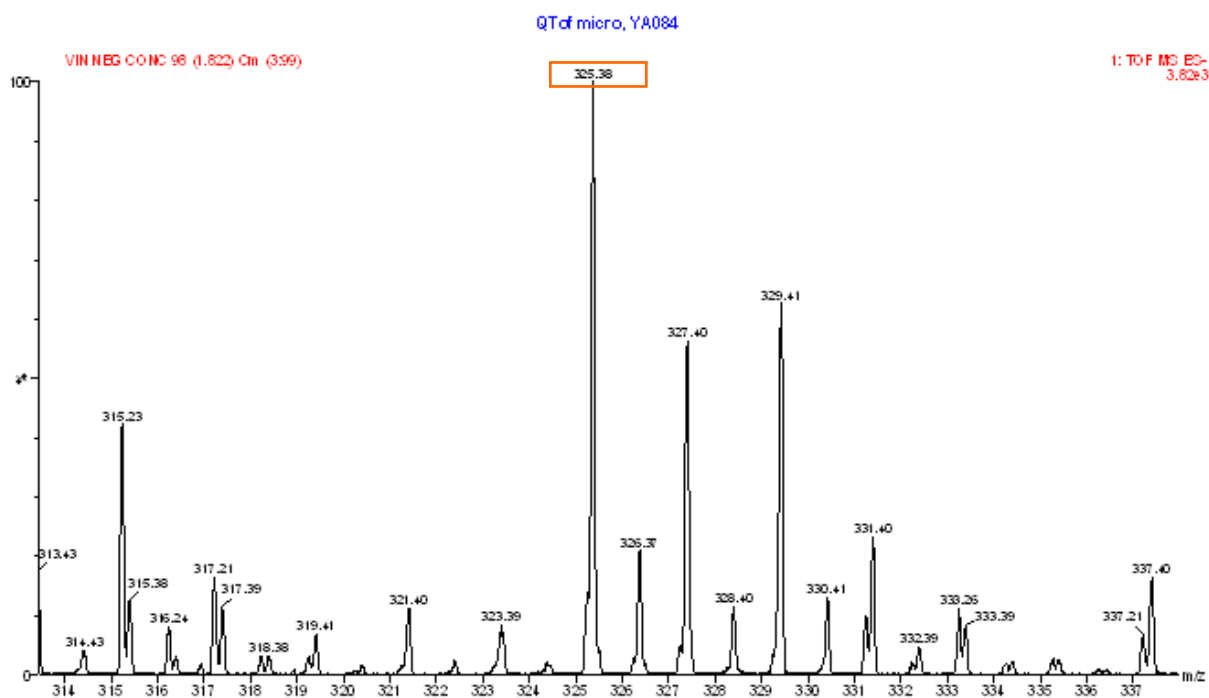
L'analisi è stata eseguita presso i laboratori CoSMeSe secondo la tecnica della cromatografia HPLC (accoppiata ad uno spettrometro di massa come rivelatore), è stata condotta con l'intento di identificare le specie chimiche più importanti, secondo quanto sopra riportato.

Catechine



(+) Catechina
(-) Epicatechina

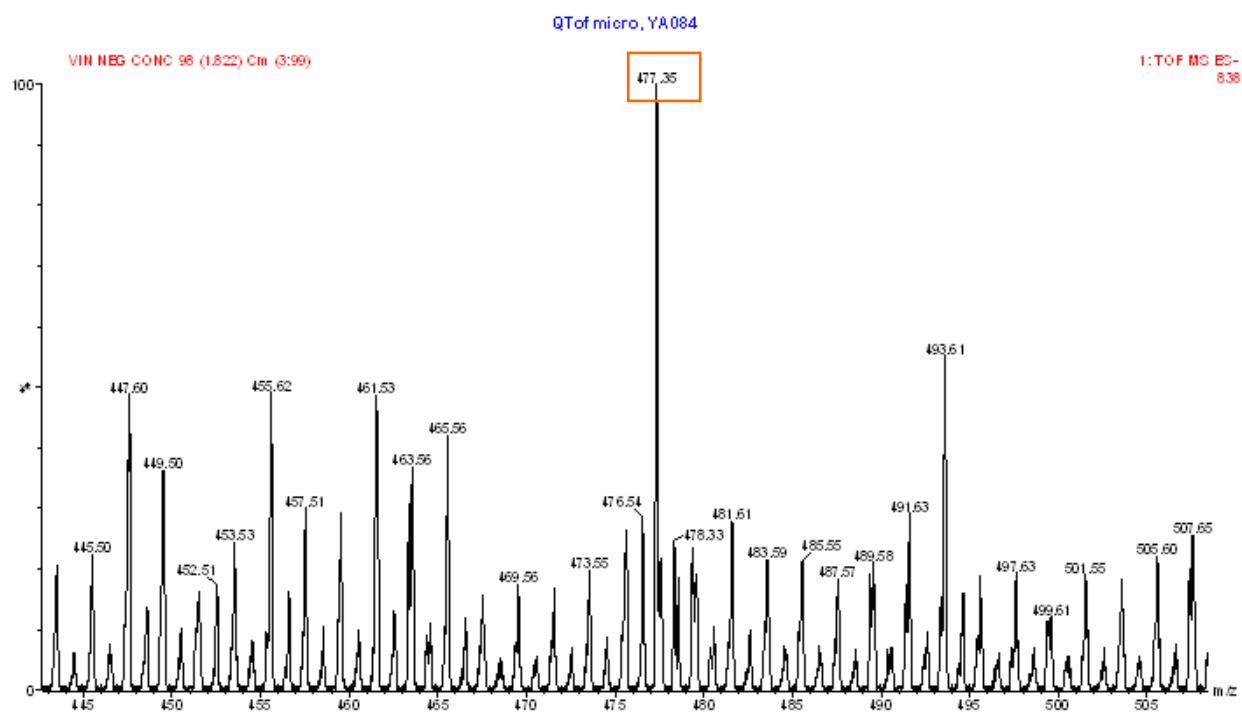
m/z 290[M-H]⁻ + Cl⁻ 325



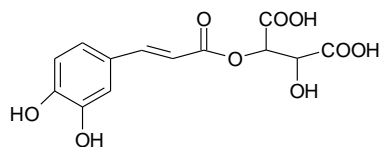
(+) Catechina gallata
(-) Epicatechina gallata (ECG)

m/z 442

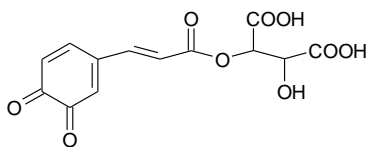
[M-H]⁻ + Cl⁻ 477



Esteri degli acidi cinnamici con acidi organici dicarbossilici



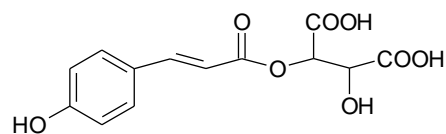
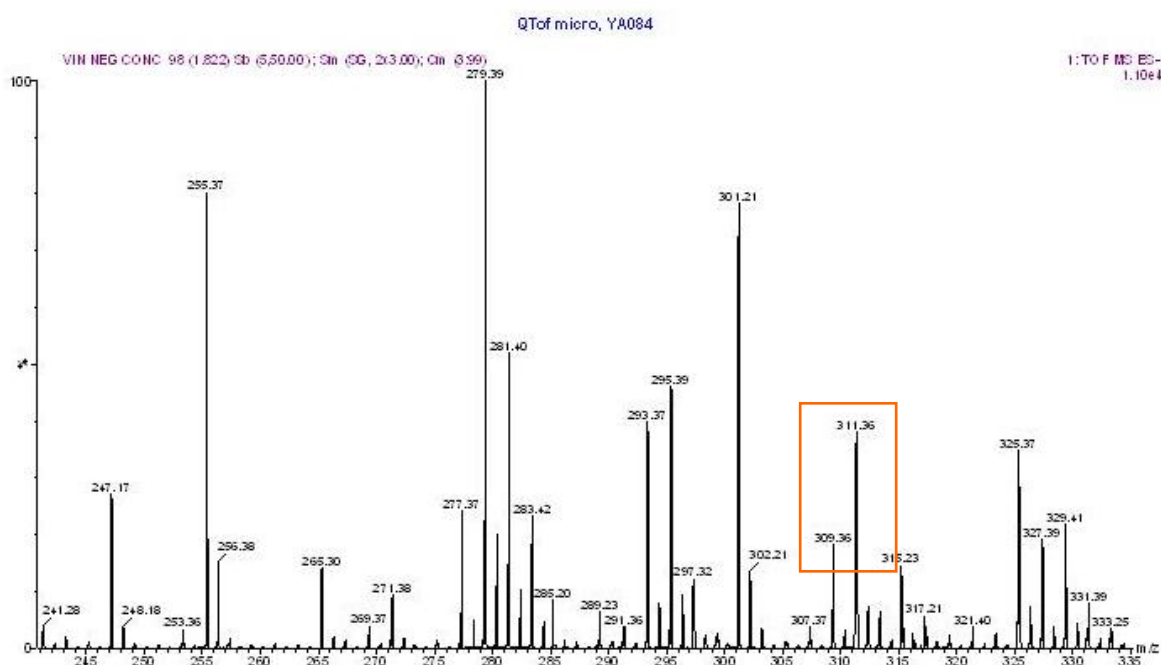
acido *trans*-caffeoil tartarico (acido caftarico)



chinone dell'acido caftarico

m/z 312

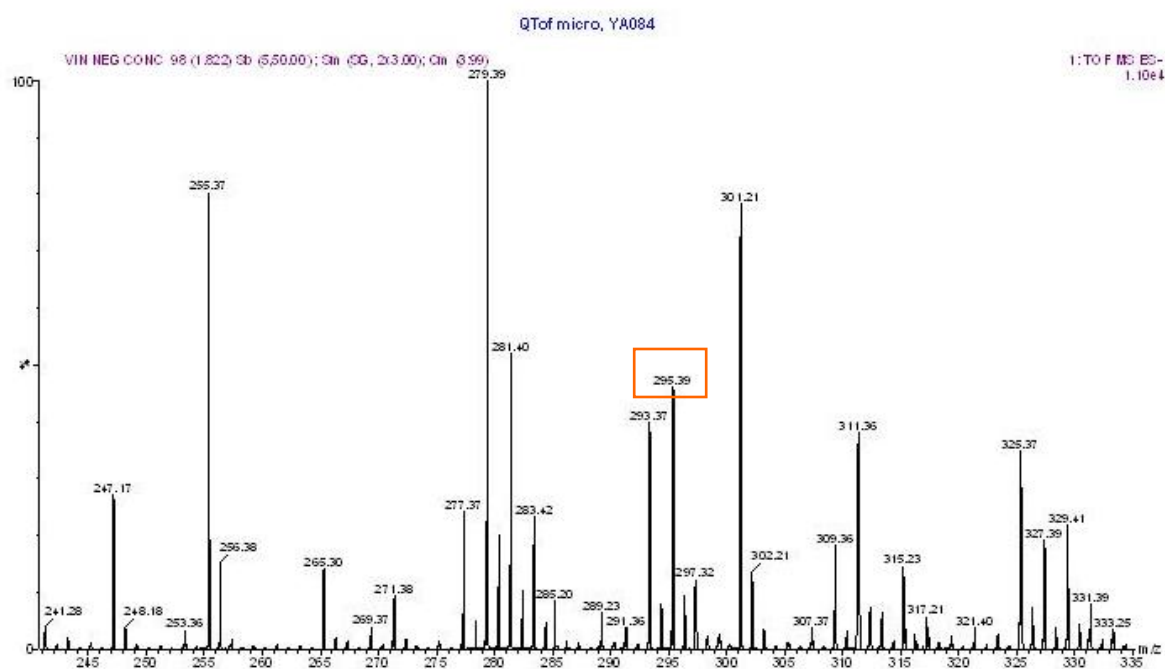
$[M-H]^- = 311$



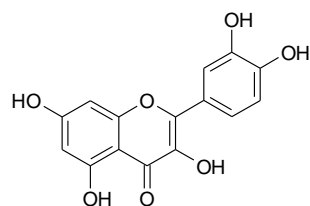
acido *trans*-cumaroil tartarico (acido cutarico)

m/z 296

[M-H]⁻ = 295



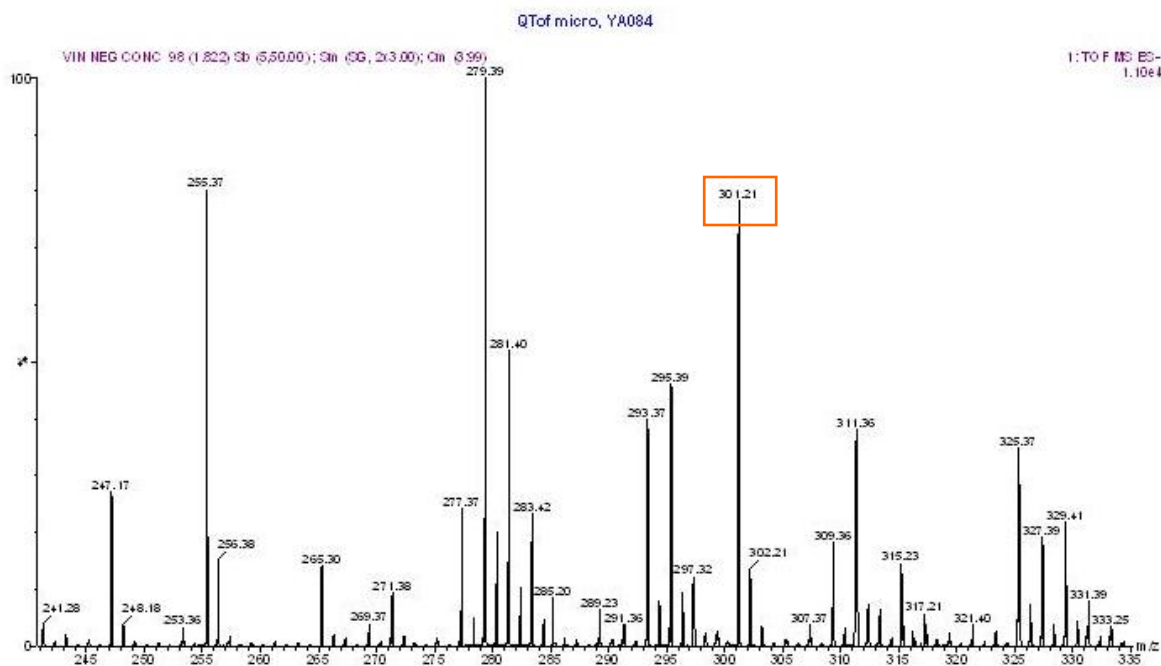
Flavonoidi



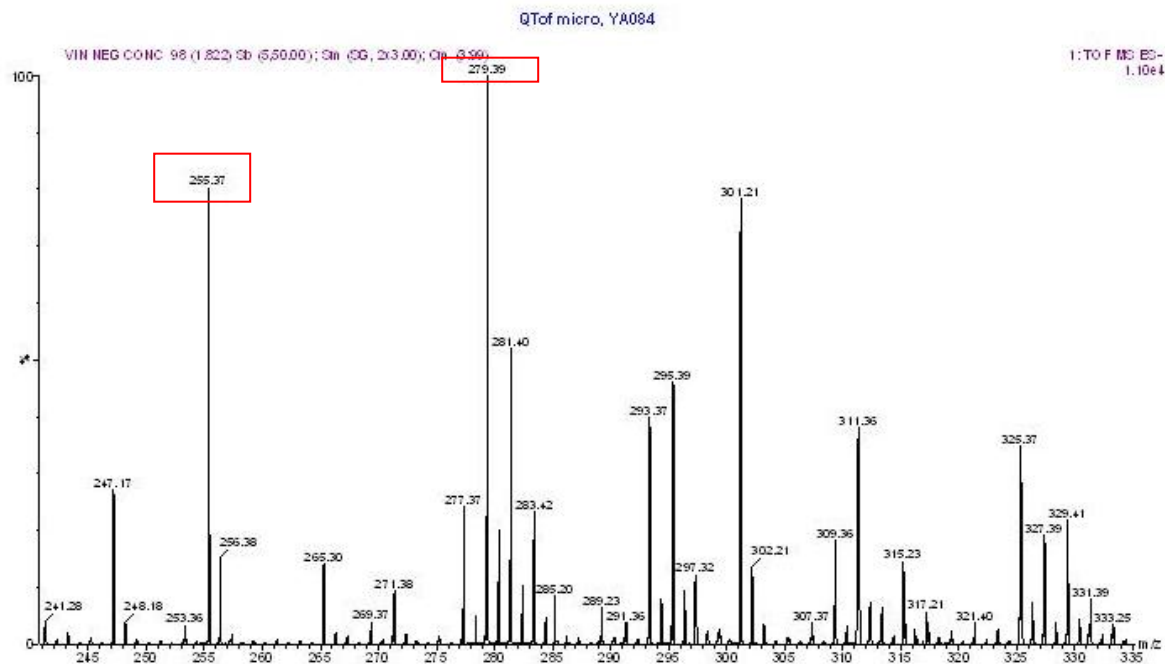
quercetina

m/z 302

[M-H]⁻ = 301



Composti sconosciuti



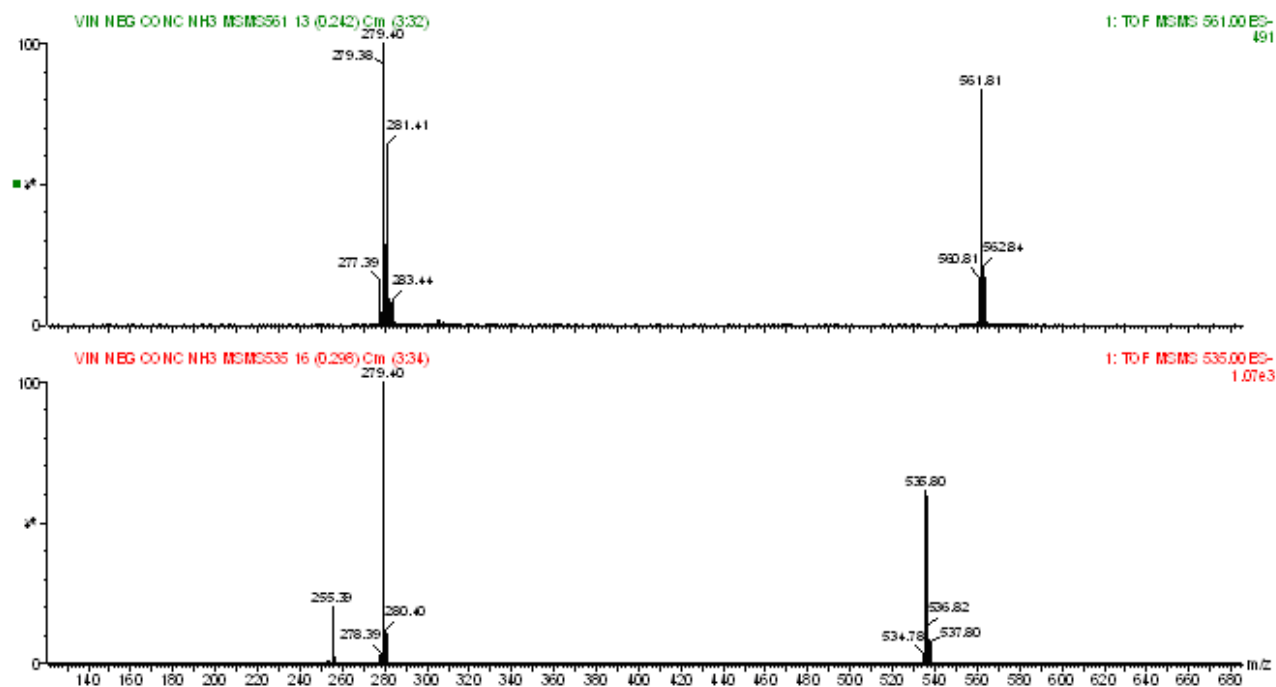
m/z 244

$[M-H]^- + Cl^- = 279$, $[2M-H]^- + Cl^- = 561$

m/z 256

$[M-H]^- = 255$ $244 + 256 + Cl^- = 535$

R



RISULTATI

Nella frazione polare, risultano presenti quantità apprezzabili di flavonoidi, mentre in quantità decisamente inferiori sono rappresentate molecole appartenenti agli acidi fenolici ed alle lignine.

Estrazione e caratterizzazione

a) Estrazione tramite fluidi super critici (SFE)

L'estratto è stato ottenuto da vinacce di uve presso il Dipartimento Scienze Chimiche dell'Università di Cagliari.

I parametri per l'estrazione in CO₂ supercritica sono stati i seguenti:

T= 60°C, P= 200bar, co-solvente= etanolo, flusso= 1ml/min).

Il campione, dalla colorazione verdastra, è stato centrifugato a 13.000 giri per 15'. La fase surnatante, fortemente colorata di verde, è stata previamente filtrata e quindi utilizzata per la determinazione dei polifenoli totali.

Gli estratti di vinacce sono stati sottoposti alla determinazione dei polifenoli totali per via spettrofotometrica attraverso saggio con il reattivo di Folin-Ciocalteu e successivamente all'analisi cromatografica in HPLC.

Si riportano di seguito i materiali e metodi utilizzati per tutti gli estratti di vinacce e i risultati ottenuti per ciascun campione.

Determinazione dei polifenoli totali - Saggio di Folin-Ciocalteu

Il contenuto polifenolico totale è stato determinato misurando l'assorbanza di una serie di soluzioni standard di acido gallico (concentrazioni da 50 a 500ppm, facili da preparare e molto stabili) e costruendo la retta di calibrazione. I campioni sono stati analizzati per via spettrofotometrica. La concentrazione totale dei polifenoli è stata ottenuta per interpolazione lineare.

Analisi Cromatografica

L'analisi qualitativa degli estratti di vinacce è avvenuta mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC) accoppiata con rivelatore UV-Vis per la determinazione dei composti antocianici.

Per lo studio qualitativo degli estratti di vinacce è stato utilizzato il sistema HPLC Agilent 1100/1200, accoppiato con rivelatore UV-Vis e corredato di software Agilent ChemStation (Rev. B.03.01.) per la valutazione dati.

In un secondo momento questo sistema è stato accoppiato con un rivelatore DAD, corredato di software Agilent ChemStation (Rev. B.04.01.).

La separazione cromatografica è stata condotta su una colonna Phenomenex Synergy 4 μ Max-RP 80Å, dimensioni 250x4.6mm ID preceduta da una precolonna Sinergy (4x3.00mm) impaccata con la stessa fase stazionaria C12.

Il volume di iniezione è stato di 10 μ l. Il programma di eluizione ha previsto un flusso costante di 0,5mL/min ed un gradiente lineare di H₂O/CH₃CN/HCOOH 87:3:10 (solvente A) e H₂O/CH₃CN/HCOOH 40:50:10 (solvente B) come riportato di seguito nella Tab. 5. Il gradiente è stato seguito da un periodo di riequilibrio (ca 10 min) con la miscela di solventi utilizzata al tempo zero, prima della successiva corsa cromatografica. L'analisi è stata condotta monitorando il segnale di assorbanza alla lunghezza d'onda di 520nm. Anche in questo caso il campione è stato filtrato con filtri di cellulosa rigenerata da 0,45 μ m prima di essere sottoposto all'analisi HPLC. I solventi utilizzati per le analisi cromatografiche sono tutti Sigma-Aldrich CHROMASOLV per "HPLC-grade" e gli standards di polifenoli sono Sigma.

	Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
1	0	94	6
2	5	94	6
3	25	80	20
4	40	60	40
5	45	40	60
6	50	10	90
7	60	10	90
8	63	94	6

Tab.4 Programma di eluizione utilizzato per la separazione delle antocianine negli estratti di vinacce.

Risultati

Il contenuto di polifenoli totali nel campione di vinacce estratto in CO₂ supercritica è risultato pari a **117.5 mg/L** (Fig. 3).

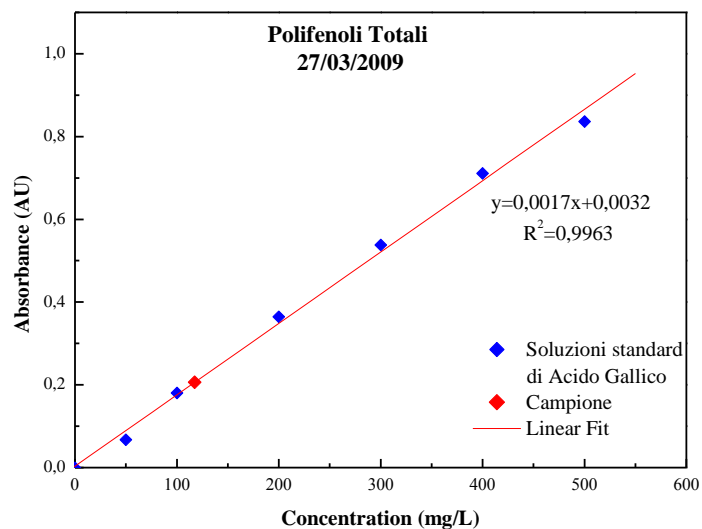


Fig. 3 Determinazione dei polifenoli totali degli estratti di vinacce.

Lo stesso campione è stato sottoposto all'analisi qualitativa mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC) accoppiata con un rivelatore UV-Vis per la determinazione del profilo antocianico e degli *trans*-resveratrolo.

Per la determinazione del *trans*-resveratrolo, è stato monitorato il segnale di assorbanza alla lunghezza d'onda di 280nm.

Nell'estratto di vinacce in SFE i composti antocianici e il *trans*-resveratrolo non sono presenti come evidenziato dalla sovrapposizione del cromatogramma di una soluzione di tre standard di antocianine e precisamente: Cyanidin-3-O-Glucoside Chloride, Peonidin-3-O-Glucoside Chloride, Malvidin-3-O-Glucoside Chloride, (linea blu) con quello di una soluzione contenente il campione di estratto di vinacce (linea rossa) (Fig. 4).

Tale limite estrattivo dei fluidi supercritici è coerente con la natura polare delle specie chimiche in esame. Per tale motivo, per le fasi successive relative alla matrice oggetto di indagine sono state utilizzate tecniche di estrazione alternative pur nella coerenza dei principi della Green Chemistry.

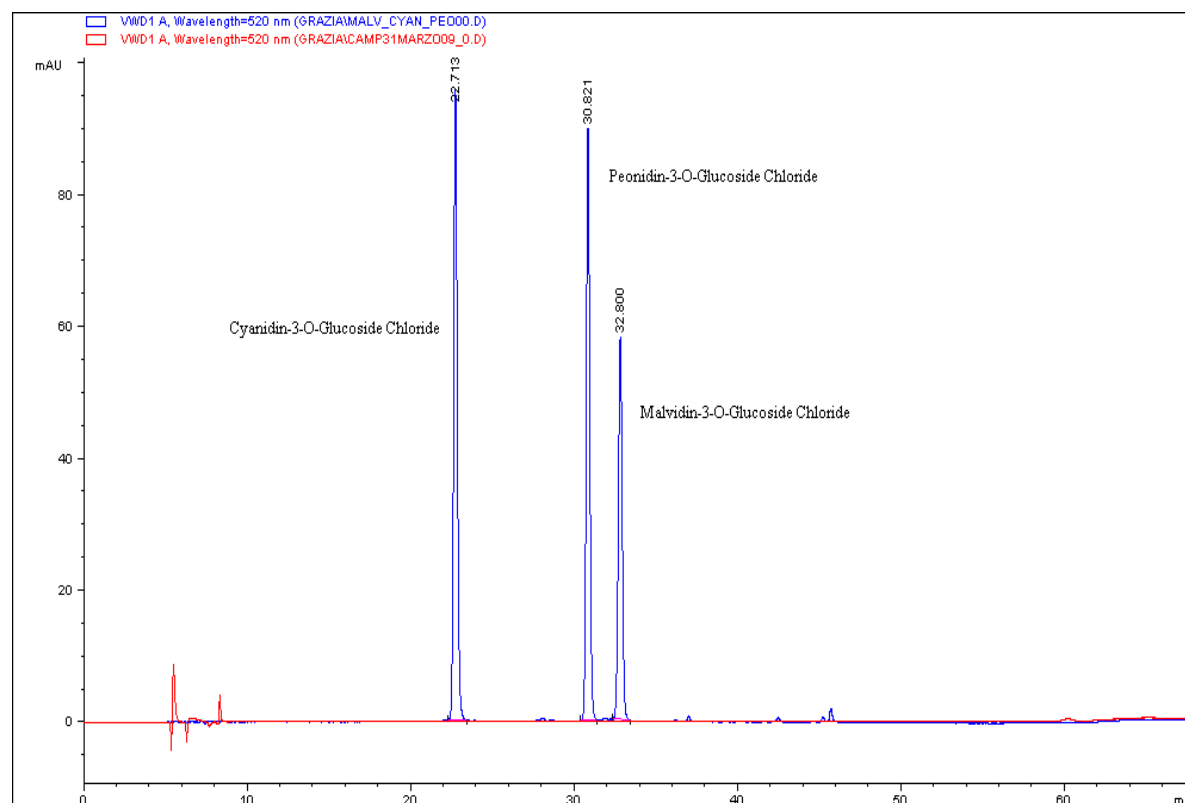
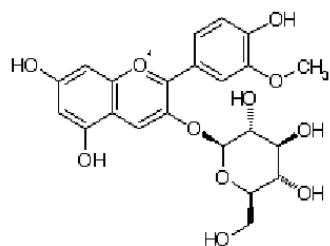
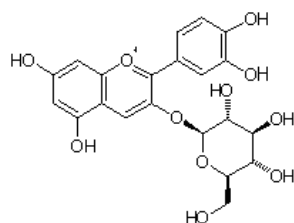


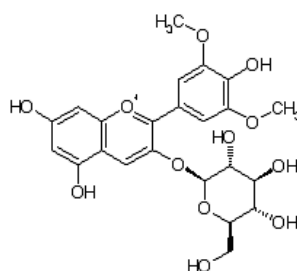
Fig. 4 Sovrapposizione dei cromatogrammi degli standard di antocianine con estratto di vinacce in SFE.



Peonidin-3-O-Glucoside



Cyanidin-3-O-Glucoside



Malvidin-3-O-Glucoside

b) Estrazione con Accelerated Solvent Extraction (ASE) 200

E' stato caratterizzato il profilo polifenolico delle matrici vinacce mediante analisi cromatografica degli estratti ottenuti con un estrattore accelerato con solvente (ASE 200).

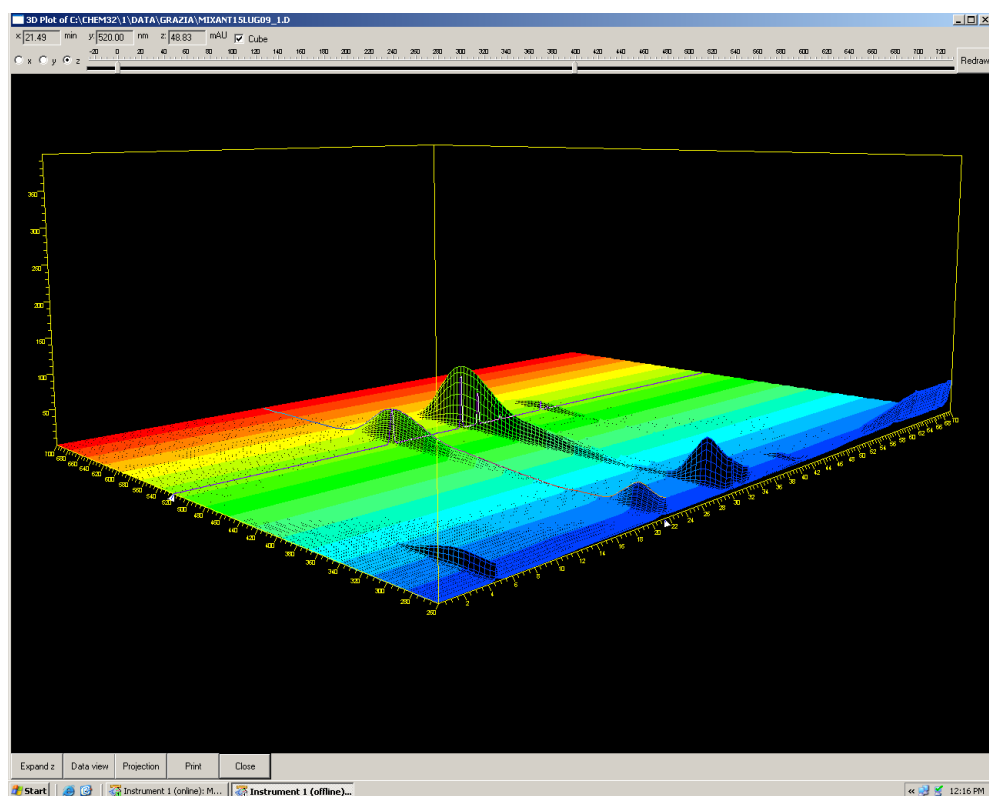
Il sistema accelera il tradizionale processo di estrazione usando solventi ad alte temperature e applicando una pressione alla cella contenente il campione.

Sono state sottoposte ad estrazione con ASE 200 le vinacce di *Cagnulari* del 2008 utilizzando come solvente di estrazione una miscela metanolo/acqua (80:20).

Una volta ottimizzata la metodica di estrazione, è stata messa a punto una metodica di preparazione all'analisi cromatografica in HPLC del campione, che consiste nella purificazione e concentrazione dell'estratto mediante estrazione in fase solida SPE (Solid Phase Extraction-SPE). Sono state utilizzate cartucce C18 Strata, (Phenomenex, 55um, 70A) equilibrate con una soluzione acquosa di HCOOH al 10%.

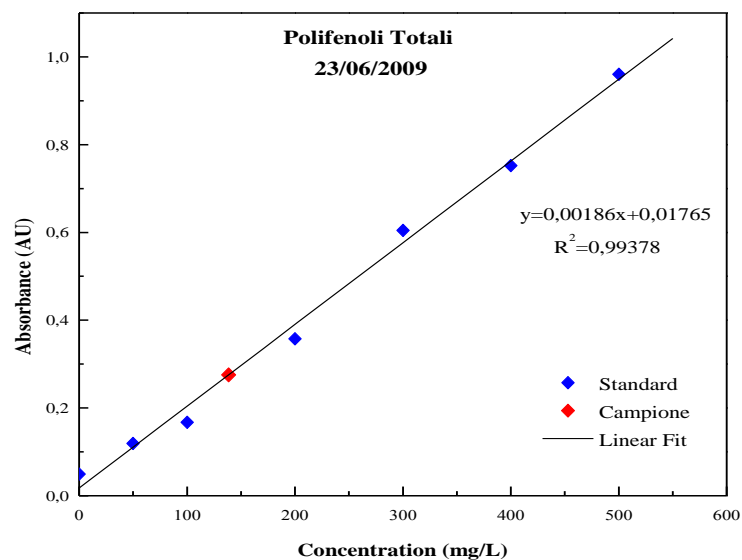
Il campione di estratto è stato eluito con i tamponi A e B che si utilizzano per la successiva analisi cromatografica in diversi rapporti di volume e sono state raccolte le frazioni eluite nelle varie condizioni. Il *solvente A* è una soluzione di H₂O/CH₃CN/HCOOH (87:3:10) e il *solvente B* di H₂O/CH₃CN/HCOOH (40:50:10). La frazione eluita con una miscela 50:50 delle soluzioni A e B, intensamente colorata di rosa, segno della presenza di composti antocianici, è stata inizialmente sottoposta al saggio spettrofotometrico con il reattivo di Folin-

Ciocalteu per la determinazione del contenuto polifenolico totale. Successivamente si è proceduto con l'analisi è stata condotta monitorando il segnale di assorbanza in particolare alla lunghezza d'onda di 520nm e registrando i cromatogrammi in tutto il range di lunghezza d'onda da 190 a 700nm (Graf. 5).



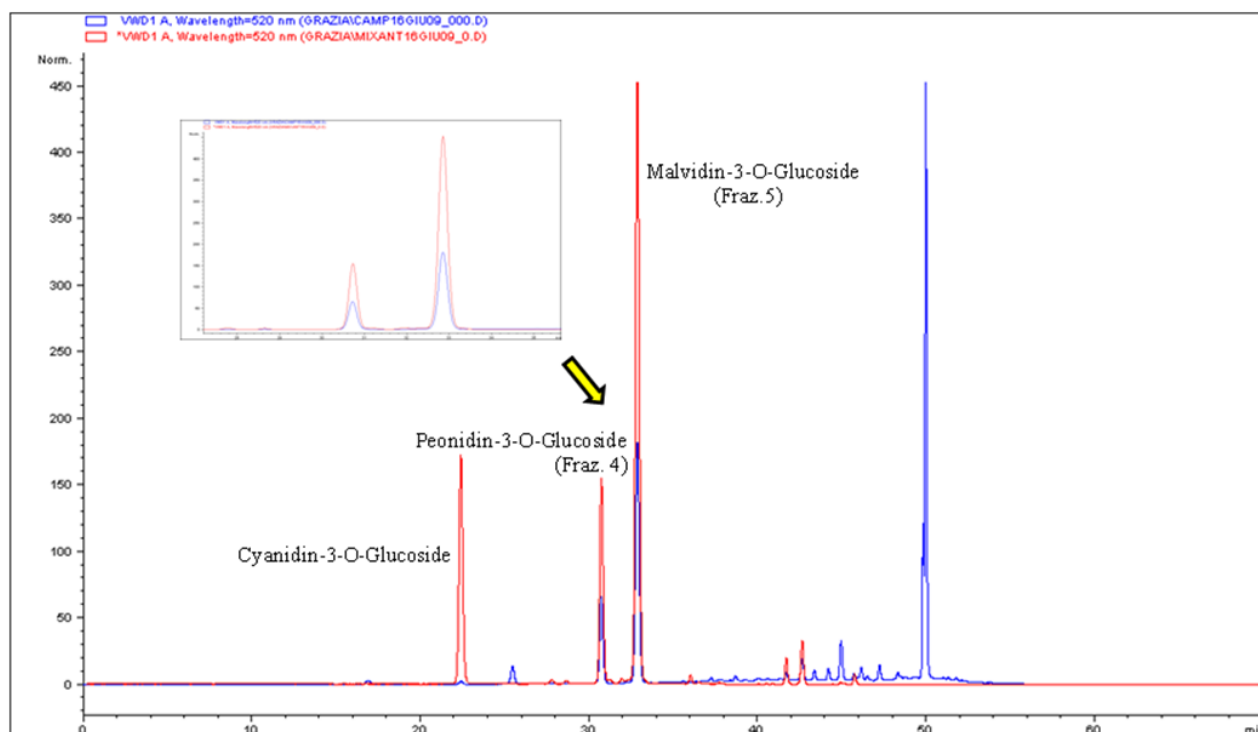
Graf. 5 Spettro 3D registrato tra 190-700nm durante l'analisi cromatografica di una miscela di tre standard di antocianine.

Tenendo conto della quantità di vinacce di *Cagnulari 2008* sottoposta ad estrazione con l'ASE 200 in questo particolare esperimento, si può concludere che il contenuto di polifenoli totali nel campione di vinacce è risultato pari a 52 mg/g di matrice (Graf. 6, Tab. 6).



Graf. 6 Determinazione dei polifenoli totali negli estratti di *Cagnulari* con ASE 200.

I cromatogrammi registrati e il relativo spettro d'assorbimento, mostrano che nei campioni di vinacce di *Cagnulari 2008* sono presenti composti antocianici. A conferma di quanto detto, si riporta di seguito (graf. 7) la sovrapposizione del cromatogramma di una soluzione di tre standard di antocianine (precisamente: Cyanidin-3-O-Glucoside Chloride, Peonidin-3-O-Glucoside Chloride, Malvidin-3-O-Glucoside Chloride, grafico rosso) con quello di una soluzione contenente il campione di estratto di vinacce di *Cagnulari 2008* (grafico blu).



Graf. 7 Sovrapposizione dei cromatogrammi degli standard (rosso) e del campione (blu).

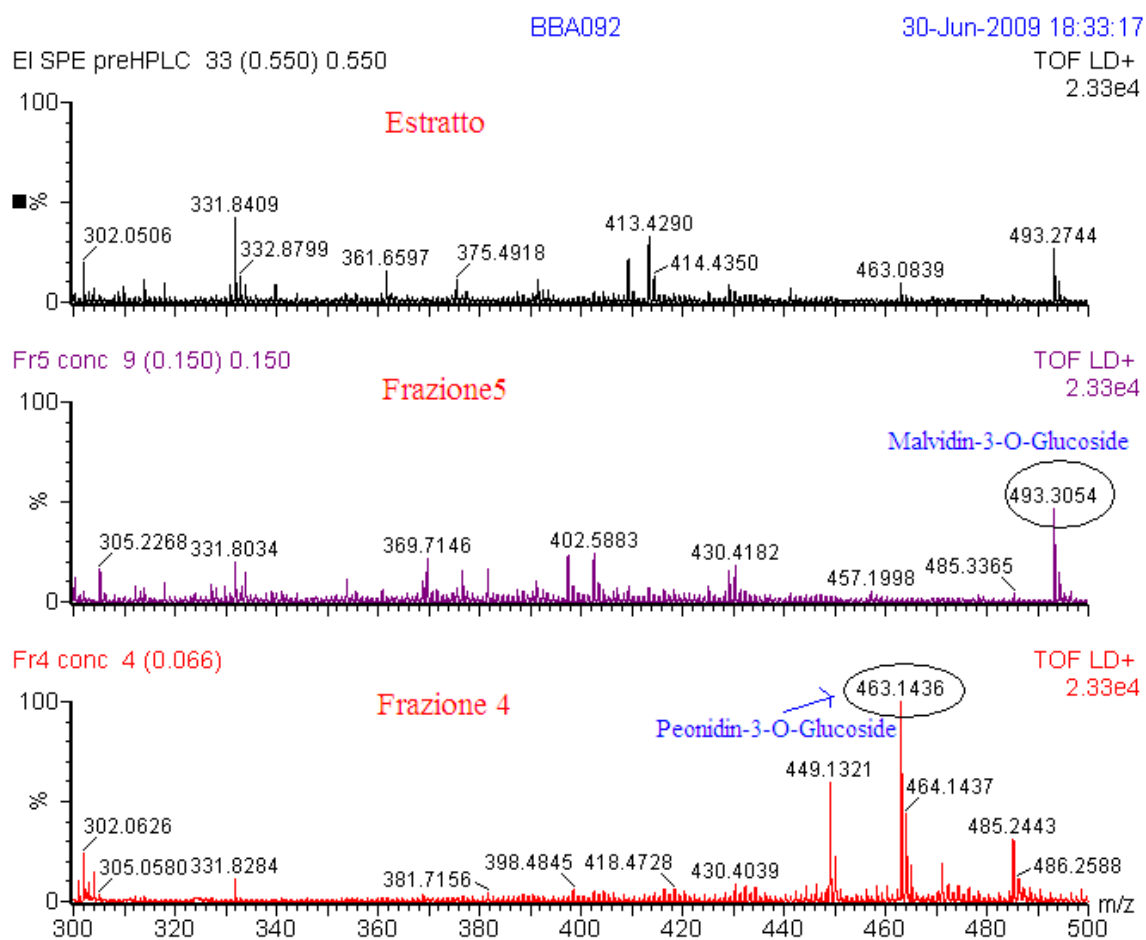
L'ingrandimento di una zona del cromatogramma registrato a 520nm, presente nel Graf. 7, mostra chiaramente come ci sia buona sovrapposizione dei picchi relativi alle sostanze standard con quelli delle sostanze presenti nel campione. La Malvidin-3-O-Glucoside risulta essere l'antocianina più abbondante nel campione, come d'altronde ci si potrebbe aspettare nelle matrici vinacce in quanto la malvidina tra le cinque antocianine più importanti è la più ossidata.

Analisi mediante Spettrometria di massa

Si è utilizzato lo spettrometro di massa MALDI-TOF micro MX (Waters), in modalità reflectron positiva.

I campioni e le frazioni sono state miscelate con un volume uguale di matrice, costituita da una soluzione di DHB (2,5-Dihydroxybenzoic acid, 20 mg/mL in acetonitrile 90% e H₂O 10%).

La calibrazione è stata condotta utilizzando una miscela di standard di antocianine.



Graf. 8 Spettri MALDI dell'estratto e di alcune frazioni selezionate.

Da un attento studio mediante spettrometria di massa MALDI-TOF del campione tal quale e delle frazioni raccolte da RP-HPLC, successivo all'analisi cromatografica, è stata confermata la presenza di alcune antocianine attese ed individuate altre specie abbondanti nel campione ancora da identificare a differenza di quanto avvenuto nell'analisi degli estratti in SFE.

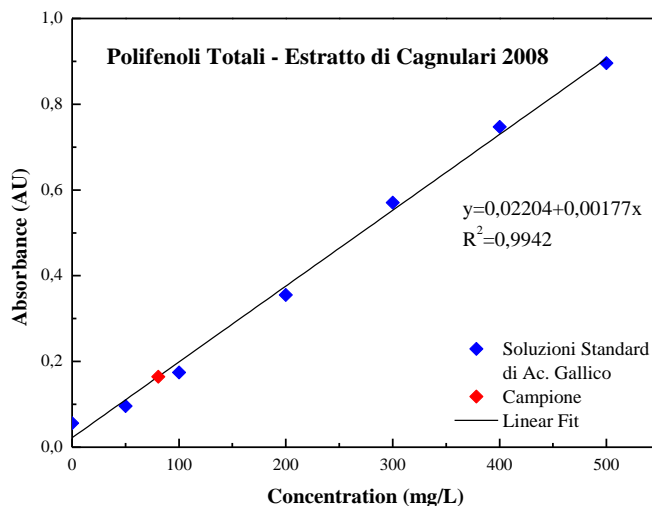
c) Estratti di vinacce *Cagnulari* con Naviglio Estrattore

L'estrattore rapido solido-liquido dinamico rappresenta una tecnologia innovativa di estrazione solido-liquido che permette di esaurire in tempi brevi, paragonato alle altre tecniche estrattive attualmente esistenti, le matrici solide contenenti sostanze estraibili in un solvente organico o inorganico ed in loro miscele. Il processo avviene a temperatura ambiente o sub -ambiente e sfrutta un aumento di pressione del liquido estraente sulla matrice solida evitando l'alterazione di sostanze termolabili. Il principio si basa sulla pressione esercitata da un pistone che agisce all'interno di una camera contenente la matrice. La miscela di solventi utilizzata nelle estrazioni con il Naviglio Estrattore è stata etanolo:acqua (40:60).

Una volta ottimizzata la metodica di estrazione si è proceduto alla preparazione dei campioni per l'analisi cromatografica in HPLC secondo i metodi messi a punto per l'analisi degli estratti con l'ASE 200.

I campioni purificati e concentrati mediante estrazione in fase solida (SPE) sono stati sottoposti al saggio spettrofotometrico con il reattivo di Folin-Ciocalteu per la determinazione del contenuto polifenolico totale.

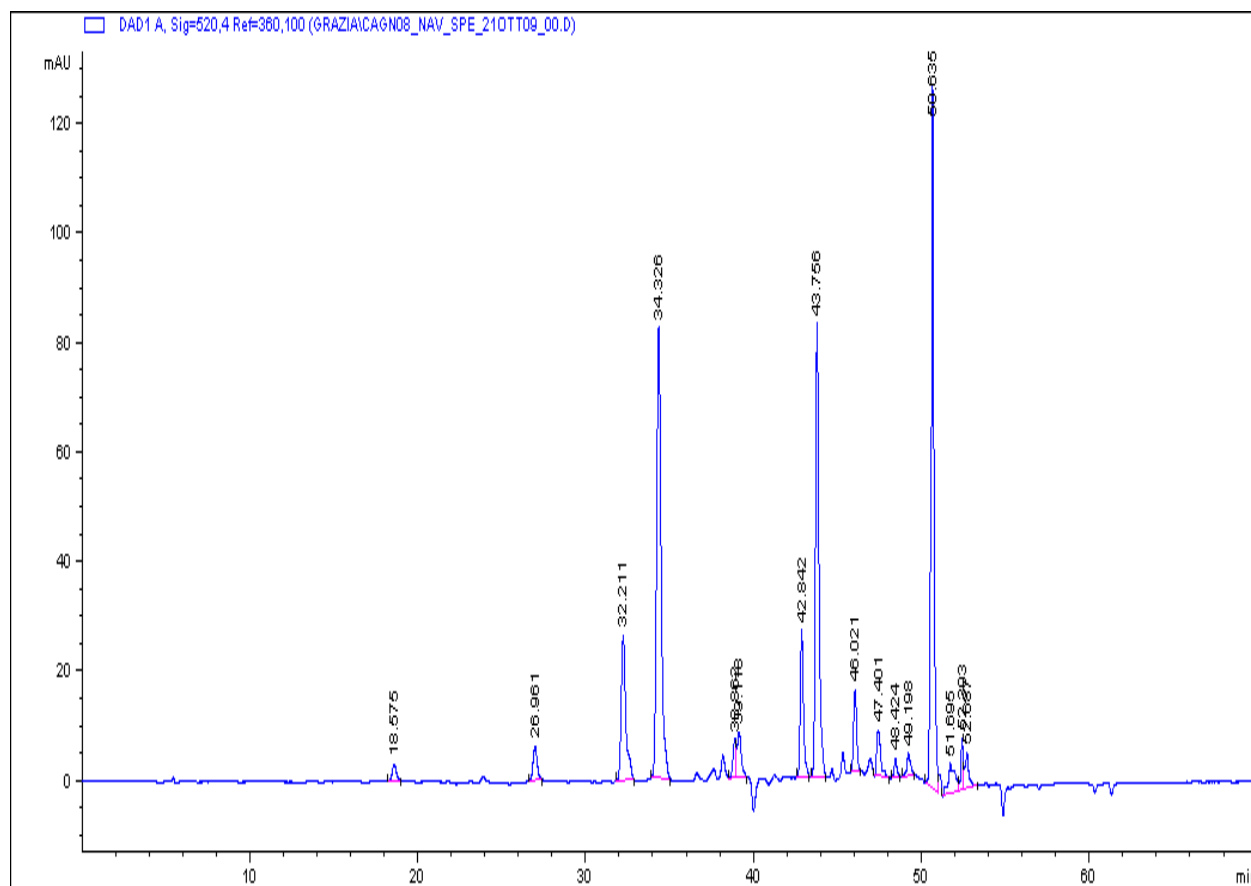
Si riportano in tab. 7 i valori dell'assorbanza delle soluzioni standard di acido gallico relativi ad un esperimento di determinazione dei polifenoli totali in un estratto con Naviglio, seguiti dalla retta di calibrazione (graf. 9).



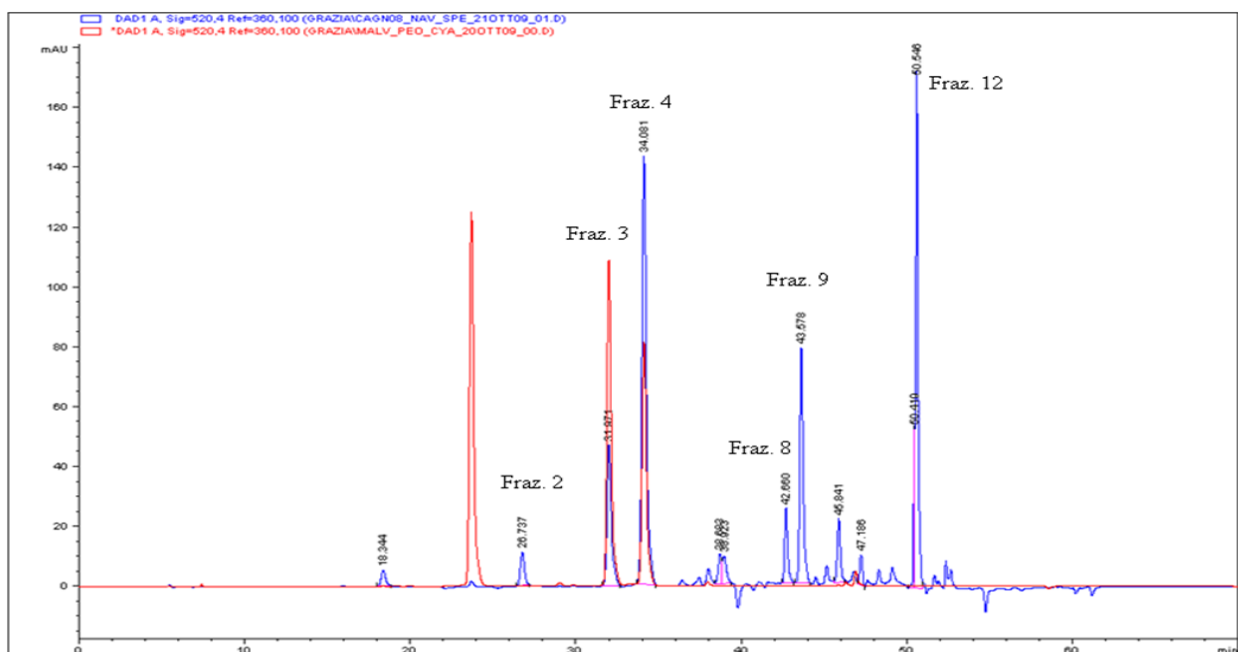
Graf. 9 Determinazione dei polifenoli totali negli estratti di Cagnulari in Naviglio.

Il contenuto di polifenoli totali nel campione è risultato pari a 12,08 mg/g di matrice, a differenza dell'estratto con l'ASE 200 che presentava concentrazioni pari a 52 mg/g di matrice. A differenza dell'esperimento condotto con l'ASE 200, c'è da considerare che nel caso dell'esperimento con il Naviglio Estrattore la matrice alla fine del processo estrattivo non era esausta, ma il contenuto di polifenoli totali in mg/L di estratto era di gran lunga superiore. Successivamente e analogamente a quanto è stato fatto con gli estratti con l'ASE 200, si è proceduto con l'analisi qualitativa del profilo antocianico della nostra frazione, mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC) accoppiata con rivelatore DAD. Il sistema HPLC e le metodiche usate per le analisi sono le stesse descritte nel paragrafo 3.2.

I cromatogrammi registrati e il relativo spettro d'assorbimento, mostrano che anche gli estratti con il Naviglio sono ricchi di composti antocianici. Si riporta di seguito (graf. 10) il cromatogramma di un estratto con il Naviglio e la sovrapposizione del cromatogramma di un estratto con quello di una soluzione di standard di antocianine (graf.11).



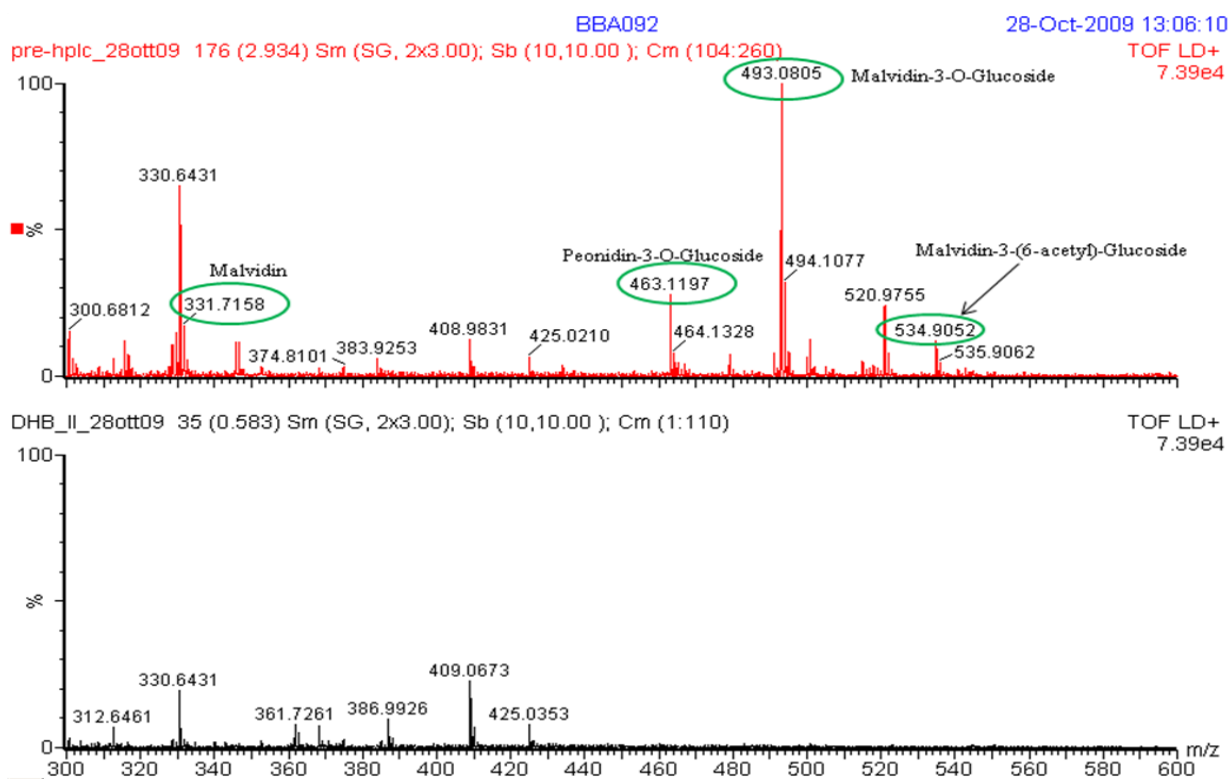
Graf. 10 Cromatogramma di un estratto con il Naviglio Estrattore.



Graf. 11 Sovrapposizione dei cromatogrammi degli standard (rosso) e del campione (blu).

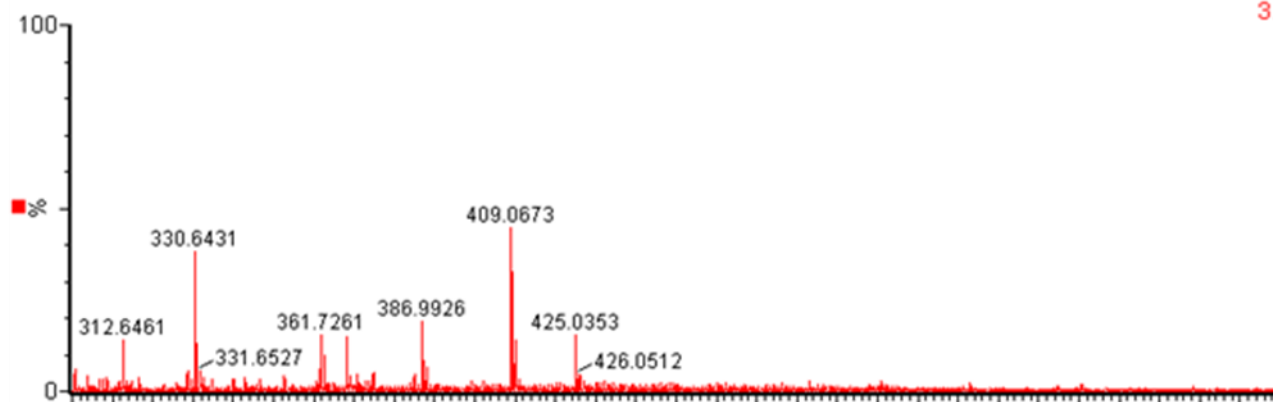
Il campione è stato inoltre sottoposto ad uno studio mediante spettrometria di massa MALDI-TOF insieme con alcune frazioni relative ai picchi più intensi.

Anche per quanto riguarda gli estratti ottenuti con Naviglio Estrattore, possiamo concludere che la Malvidin-3-O-Glucoside risulta essere l'antocianina più abbondante. Come esempio, riportiamo nei grafici 12 e 13 lo spettro di massa di un campione di estratto con il Naviglio in cui sono illustrati alcuni dei segnali identificati.

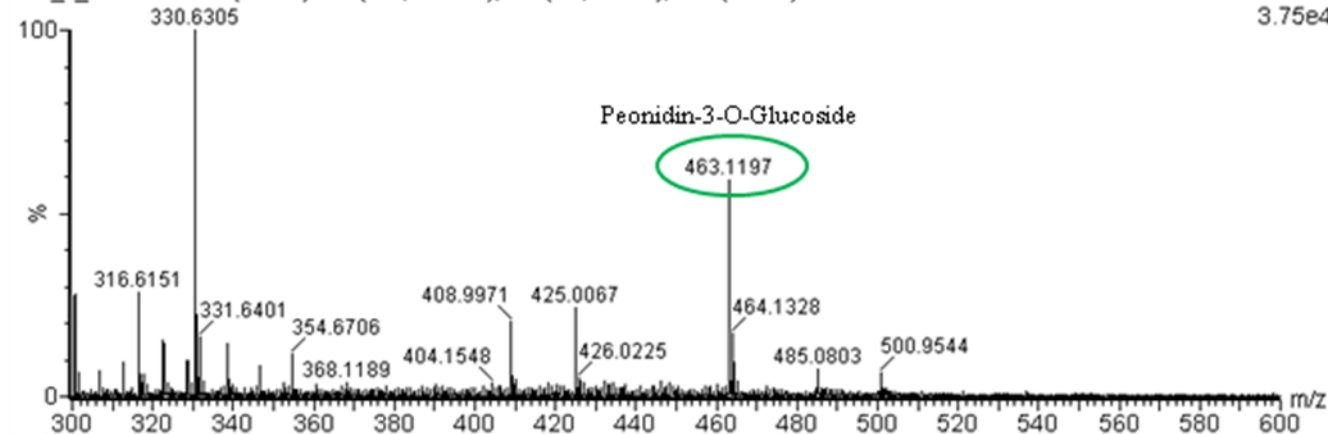


Graf. 12 Spettri MALDI dell'estratto prima dell'analisi cromatografica (pre-HPLC) e della matrice DHB.

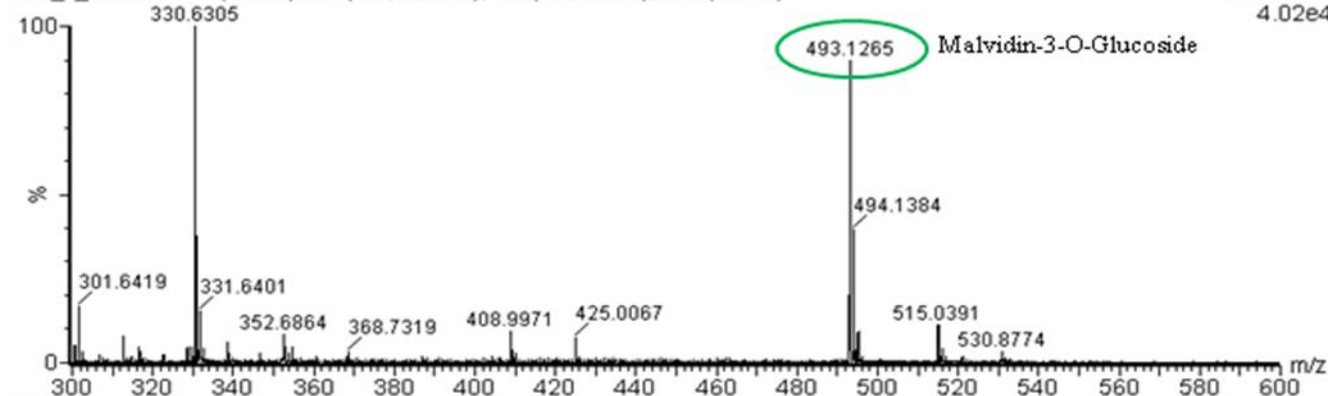
DHB_II_28ott09 35 (0.583) Sm (SG, 2x3.00); Sb (10,10.00); Cm (1:110)

TOF LD+
3.75e4

frz3_II_28ott09 120 (2.000) Sm (SG, 2x3.00); Sb (10,10.00); Cm (1:241)

TOF LD+
3.75e4

frz4_II_28ott09 18 (0.300) Sm (SG, 2x3.00); Sb (10,10.00); Cm (1:110)

TOF LD+
4.02e4

Graf. 13 Spettri MALDI di alcune frazioni selezionate e raccolte durante l'analisi (fraz. 3 e fraz. 4).

Da quanto fin'ora esposto, risulta evidente che l'estrazione della frazione polifenolica in fluidi supercritici (SFE) pur essendo probabilmente quella che più di ogni altra può essere utilizzata in un'ottica industriale, risente in maniera determinante della natura polare di questi composti.

I risultati ottenuti tramite ASE sono confortanti dal punto di vista analitico, e dovrebbero essere verificate le condizioni per uno sfruttamento su scala industriale. Per quanto attiene l'estrazione operata con il Naviglio Estrattore, è evidente una migliore *performance* nell'estrazione di molecole di interesse farmaceutico ed industriale presenti nelle vinacce esauste. Allo stato attuale, pur riconoscendo le ottime potenzialità della metodica di estrazione, non è possibile dare indicazioni precise riguardo alla sua applicazione su scala industriale.

ATTIVITÀ BIOLOGICA

Premessa

Nella ricerca di composti terapeutici utili nei confronti di varie malattie, molti prodotti naturali sono stati studiati negli ultimi anni, con promettenti prospettive. Molta attenzione è stata concentrata sui potenziali effetti benefici a livello cardiovascolare dei componenti della dieta mediterranea, come il vino rosso e l'olio d'oliva. Alla base degli effetti sulla salute umana da parte di molecole d'origine naturale, vi è la loro azione antiossidante. Infatti un aumentato stress ossidativo dovuto ad uno squilibrio dell'omeostasi redox cellulare è stato associato sia all'insorgenza di patologie cardiovascolari, quali ipertensione e arteriosclerosi, che tumorali. L'azione antiossidante di tali composti dovrebbe infatti, riducendo le specie reattive dell'ossigeno (ROS), diminuire lo stress ossidativo prevenendo o attenuando l'insorgenza o progressione di tali patologie. Tuttavia i ROS, sebbene implicati nell'inizio e nella progressione di parecchi stati patologici vascolari, sono anche in grado di svolgere importanti ruoli fisiologici agendo come intermedi nella trasduzione del segnale cellulare, modulando importanti risposte fisiologiche. A causa del duplice ruolo sia protettivo che deleterio dei ROS, le strategie utilizzate per ridurre la loro concentrazione nelle cellule, allo scopo di prevenire il danno e la disfunzione vascolare, possono avere l'effetto contrario e portare al danno cellulare promuovendo così l'insorgenza di patologie vascolari.

Lo scopo è stato quello di valutare l'attività antiossidante e antiproliferativa degli estratti vegetali in studio su modelli cellulari di endotelio: cellule endoteliali umane estratte dalla vena del cordone ombelicale umano (HUVEC) e cellule endoteliali immortalizzate (ECV 304). La fisiopatologia delle cellule endoteliali è influenzata dai ROS che quando sono presenti in concentrazioni elevate inducono apoptosi, fenomeno determinante nel processo aterosclerotico. Comunemente si ritiene quindi che la funzione svolta dai ROS sia negativa spingendo ad un uso terapeutico e preventivo di molecole con proprietà antiossidante. In realtà i ROS non solo causano e regolano l'apoptosi, ma controllano anche eventi quali proliferazione e crescita cellulare e di conseguenza l'utilizzo sfrenato di antiossidanti potrebbe non essere benefico.

Chimicamente i ROS sono intermedi metabolici dell'O₂, parzialmente ridotti e altamente reattivi e si possono formare durante la fase di trasferimento degli elettroni nella fosforilazione ossidativa. Essi includono l'anione superossido (O₂^{-·}) e il perossido di idrogeno (H₂O₂). In presenza di metalli ionici di transizione, si può formare il radicale idrossilico (OH·) anche esso molto reattivo e tossico.

Nella cognizione comune i ROS sono considerati prodotti tossici del metabolismo cellulare. Quando sono prodotti in concentrazioni elevate e la loro presenza persiste nel tempo, possono danneggiare la cellula compromettendone l'integrità e funzionalità. Diversi lavori in letteratura hanno riportato che alte, ma non letali, concentrazioni intracellulari di ROS causano un blocco del ciclo cellulare: l'arresto del ciclo cellulare può essere un evento transiente in cui la cellula, allertata della sua condizione di stress, reagisce riparando gli

eventuali danni e ripristinando la condizione fisiologica. In taluni casi però, qualora il livello di ROS rimanesse alto e protratto nel tempo, la cellula subirebbe danni più consistenti entrando o in apoptosi o in necrosi. La presenza di antiossidanti potrebbe promuovere benefici alla cellula abbassando il livello delle specie reattive dell'ossigeno e riducendone i danni causati da tali molecole. L'attività antiossidante di questi composti dipende dalla loro struttura e dal numero dei loro gruppi idrossilici. Le proprietà antiossidanti di molti prodotti naturali sono spesso legate alla loro capacità di scavengerizzare direttamente alcune specie radicaliche, agendo quindi come antiossidanti *chain-breaking*.

L'attività antiproliferativa è stata valutata sugli stessi modelli cellulari mediante la capacità di inibire la sintesi del DNA cellulare da parte degli estratti.

Il modello cellulare utilizzato per gli esperimenti sono le cellule endoteliali umane: infatti l'endotelio vascolare svolge un ruolo importante nella regolazione del tono vascolare della pressione sanguigna, della coagulazione, della reattività immunologica e del trasporto dei lipidi. Inoltre svolge un ruolo vitale nella regolazione del passaggio dei fluidi, soluti e cellule dal sangue ai tessuti. L'alterazione della permeabilità vascolare contribuisce a varie patogenesi e porta a diverse malattie come aterosclerosi e danno infiammatorio. La progressione di queste malattie è associata alla presenza di ROS, che, se presenti ad alte concentrazioni, portano all'attivazione di eventi che condurrebbero alla morte cellulare. Il modello cellulare utilizzato quindi si adatta molto bene alla linea di ricerca portata avanti.

Tutti gli estratti sono stati solubilizzati in solventi opportuni ed utilizzate a concentrazioni adatte ai modelli cellulari endoteliali sulla base di informazioni ottenute dalla letteratura.

Per la misurazione dei ROS, le cellule sono state piastrate in una piastra nera per fluorescenza da 96 pozzetti (96 F nunclon delta Black) a 37°C. Le cellule sono state trattate con le diverse concentrazioni degli estratti vegetali disciolti nei diversi solventi. L'attività degli estratti è stata misurata anche in condizione di stress ossidativo indotto dall'utilizzo di H_2O_2 e confrontata con le condizioni basali. L' H_2O_2 è stata aggiunta per 2 ore prima dell'aggiunta dei diversi estratti per i quali la valutazione del loro effetto sulla modulazione dei radicali liberi è stata fatta durante una cinetica di 120 minuti in presenza di una sonda fluorescente. Infatti la quantità dei ROS intracellulari è stata misurata usando la sonda diclorofluoresceina diacetato (H2DCF-DA). Questa, una volta entrata nella cellula, viene disesterificata a H2DCF e quindi ossidata dai ROS (principalmente dall' H_2O_2) in un composto fluorescente, il DCF. Dopo 30 minuti di preincubazione, per permettere alla sonda di entrare nelle cellule, è stata misurata la produzione dei ROS, in assenza e in presenza di diverse concentrazioni degli estratti vegetali, usando un lettore di piastre da 96 pozzetti (Tecan GENios plus) con filtro per la lunghezza d'onda di eccitazione a 485 nm e di emissione a 535nm.

La formazione dei ROS intracellulari è stata misurata cineticamente per un tempo di 2 ore usando come controllo cellule non trattate e i risultati anti- e pro-ossidanti sono stati valutati confrontando le pendenze ottenute dalle misurazioni cinetiche. I dati sono espressi come % rispetto al controllo considerato il 100%.

Per la valutazione sugli effetti anti- o pro-proliferativi, la misurazione è avvenuta tramite l'utilizzo di un colorante che si intercala nel DNA cellulare, la cui determinazione dà un valore proporzionale alla quantità di DNA cellulare neoformato. La misurazione del DNA neoformato è indice della proliferazione cellulare e quindi del trattamento applicato sulla stessa. Le cellule sono state messe in coltura in una piastra nera per fluorescenza da 96 pozzetti (96 F nunclon delta Black) a 37°C e trattate per 24 ore con le diverse concentrazioni degli estratti vegetali disciolti nei diversi solventi. Al termine di questo periodo è stata aggiunta la sonda fluorescente (CyQuant NF Cell Proliferation, Molecular Probes) per 30 minuti alla fine dei quali, dopo opportuno lavaggio, la fluorescenza è stata letta usando un lettore di piastre da 96 pozzetti (Tecan GENios plus) con filtro per la lunghezza d'onda di eccitazione a 485 nm e di emissione a 535nm.

Valutazione dell'attività biologica

L'estratto di vinacce in SFE, si scioglie in etanolo. E' stata preparata una soluzione al 2,5% e da quest'ultima abbiamo testato sulle cellule tre concentrazioni, 0,01%; 0,05%; e 0,1%, confrontando il tutto con cellule di controllo a cui sono state aggiunte quantità simili di etanolo.

Attività antiossidante in ECV 304 (vedi fig. 10)

Le vinacce riducono del 70% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo per tutte le concentrazioni analizzate. Dopo stress ossidativo l'estratto di vinacce riduce del 60% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo per tutte le concentrazioni usate.

Attività antiproliferativa in ECV304 (vedi fig. 12)

Non si osserva alcuna differenza significativa fra il controllo ed i trattati.

L'estratto di vinacce in Naviglio Estrattore®, liquido, si scioglie in acqua. E' stata preparata una soluzione al 10% e da quest'ultima sono state testate sulle cellule tre concentrazioni, 0,01%; 0,05% e 0,1%, confrontando il tutto con cellule di controllo non trattate.

Attività antiossidante in ECV 304 (vedi fig. 11)

L'estratto riduce di circa il 65 % la quantità di radicali liberi rispetto al controllo per tutte e tre le concentrazioni utilizzate. Dopo stress ossidativo, l'estratto di cagnulari riduce del 50% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo per le due concentrazioni 0,01% e 0,05% mentre la concentrazione 0,1% riduce del 60%.

Attività antiproliferativa in ECV304 (vedi fig. 12)

Non si osserva alcuna differenza significativa fra il controllo ed i trattati.

Da quanto detto si può concludere che la metodica estrattiva non evidenzia differenze sostanziali nelle attività biologiche effettuate.

Sansa

I campioni di sansa provenienti da due diverse tecnologie di trasformazione delle olive, in due annate diverse, sono stati conferiti dalla società Co.par.

Una volta giunte presso il centro di Porto Conte Ricerche, sono state sottoposte a deumidificazione e quindi stoccate in attesa della fase di estrazione ed analisi. Un aliquota è stata inviata presso il laboratorio della Cos.me.se per l'analisi della frazione polare.



Predisposizione della matrice sansa alla deumidificazione.

La fase di estrazione è stata concordata con il Prof. Marongiu del Dipartimento Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Cagliari. L'analisi degli estratti è stata effettuata presso Porto Conte Ricerche, per la parte relativa alla quantificazione della molecola dello squalene. Tale molecola, è stata identificata fin dalle prime fasi progettuali quale molecola target, per la matrice sansa. È noto infatti che lo squalene sia il precursore biochimico degli steroidi e di anti ossidanti ed utilizzato in molti preparati farmaceutici ed integratori alimentari. Infatti, viene generalmente utilizzata in preparati per nutrire la pelle, per alleviare il dolore e l'infiammazione delle articolazioni, per migliorare la funzione respiratoria come corroborante nella difesa contro raffreddori ed influenza, come potenziante delle masse muscolari nelle palestre. Inoltre, può venire impiegato come catalizzatore nella preparazione di alcuni tipi di vaccini e, date le sue proprietà antiossidanti, come stabilizzatore degli stessi.

Vengono di seguito riportate le analisi relative alla frazione polare della matrice, e di quelle apolare degli estratti.

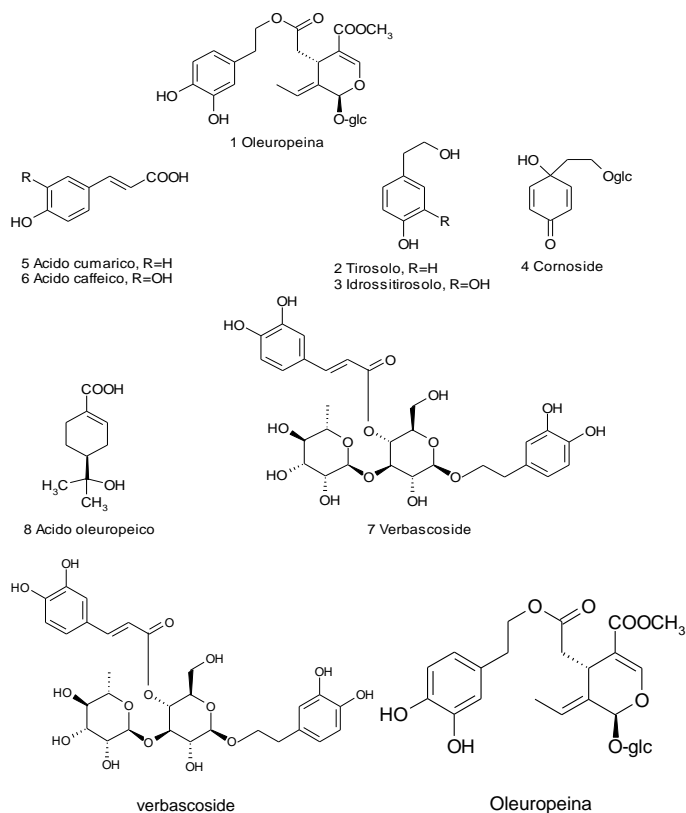
Frazione polare

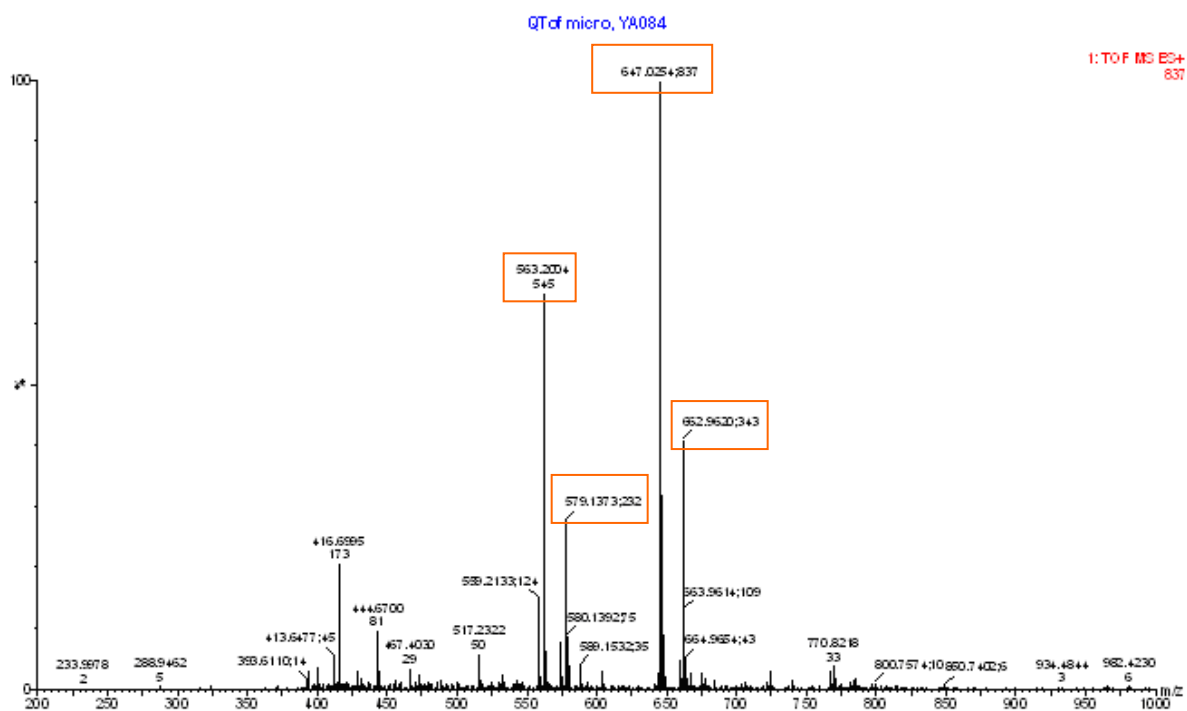
In particolare, sono state effettuate le valutazioni dei componenti polari a carattere fenolico del campione di sansa, sia dal punto di vista qualitativo che da quello quantitativo.

Dalle analisi eseguite mediante cromatografia HPLC (accoppiata ad uno spettrometro di massa come rivelatore), risulta evidente la presenza, come componenti maggioritari, di alcoli fenil-etilici, di acidi fenolici e di derivati dell'oleuropeina e del ligstroside. E' ancora da verificare la presenza di flavonoidi e di lignani

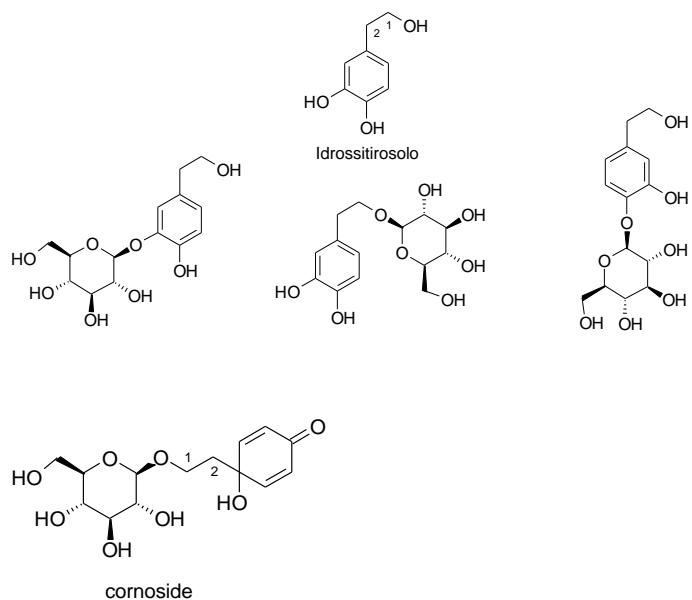
Il contenuto fenolico totale, determinato mediante la metodologia di Folin-Ciocalteu, è risultato del 32.8%, così ripartito:

- oleuropeina (1) e prodotti di degradazione 2.6%
- acidi cinnamici, in particolare acido p-cumarico (5) e acido caffeico (6) 11.3%
- alcoli feniletilici, come tirosolo (2), idrossitirosolo (3) e loro glucosidi 10.4%
- composti correlati biologicamente agli alcoli feniletilici, come il cornoside (4) 1.3%
- fenilpropanoidi, come il verbascoside (7) 1.2%.





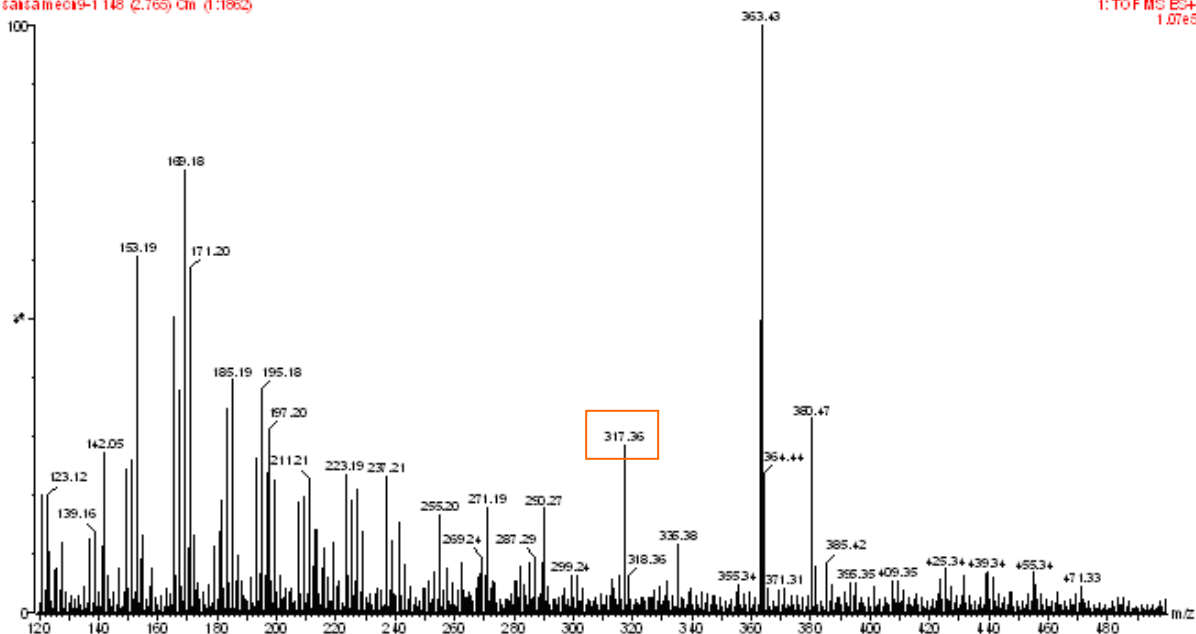
1.

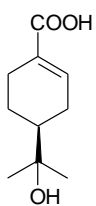


QT of micro, Y4084

saisameo9-1148 (2.765) Cm (1:1862)

1: TO F MS ES+
1.07e5



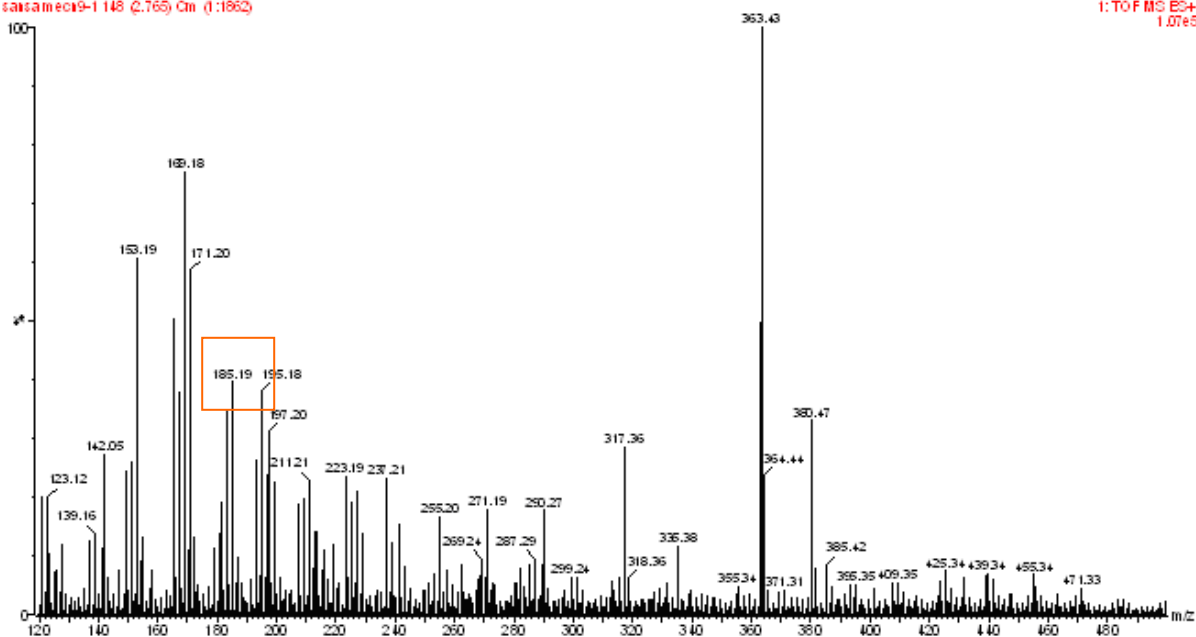


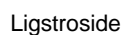
acido oleuropeico

QT of micro, YA084

saismecol9-1148 (2.765) On (1:1862)

1: TO F MS ES+
1.07e5





QT of micro. Y9084



46

Frazione apolare

Vengono di seguito riportate le condizioni di estrazioni in impianto di CO₂ Supercritico di laboratorio (Dipartimento Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Cagliari: campioni "SFE") e di impianto pilota (Porto Conte Ricerche: campioni "sa-sb").

Condizioni di estrazione su scala di laboratorio

Pressione (bar)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Portata del solvente (Kg/h)	Resa (%)	squalene (µg/mg)
200	40	2			19,23
200	40	5			6,39
250	40	2			9,47
300	40	2			10,34
soxhlet					4,88

Condizioni di estrazione su scala pilota

Pressione (bar)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Portata del solvente (Kg/h)	Resa (%)	squalene (µg/mg)
500	40	2	12	2,2	13,64
500	40	4	12	4,7	10,07
500	40	2	19,2	7,4	7,49
500	40	4	19,2	11,5	5,50
600	40	2	19,2	2,7	8,30
600	40	4	19,2	9,4	4,86

Gli estratti sono stati caratterizzati tramite HPLC

mg FA/mg rispettivi di olio	acidi grassi saturi								acidi grassi polinsaturi				Squalene
	8:0	10:0	12:0	14:0	15:0	16:0	18:0	20:0	18:1	18:2	18:3-n3	CLA	
sansa SOX HLET 0,2656 g	0,00	0,02	0,02	0,11	0,03	36,07	7,27	1,52	184,19	46,27	2,04	0,78	1,30
sansa SFE 200bar 40°C 2h 0,5032 g	0,03	0,01	0,04	0,21	0,08	70,54	10,82	1,76	302,02	75,42	3,79	1,15	9,68
sansa SFE 200bar 40°C 5h 0,5470 g	0,01		0,01	0,12	0,06	68,24	11,26	2,00	309,88	80,45	1,52	2,67	3,50
sansa SFE 300bar 40°C 2h 0,5318 g	0,02	0,01	0,02	0,20	0,09	82,89	13,20	2,26	372,22	95,96	4,58	1,22	5,50
sansa SFE 250bar 40°C 2h 0,5290 g	0,02	0,01	0,01	0,13	0,06	60,90	9,85	1,72	281,55	71,34	3,47	0,92	5,01

Nella tabella seguente la comparazione tra i dati analitici delle differenti condizioni di estrazione relativamente alla resa in squalene ($\mu\text{g}/\text{mg}$ di estratto)

Campioni	squalene ($\mu\text{g}/\text{mg}$ di estratto)
-----------------	--

4h 500bar 1sb	8,278
4h 500bar 2sb	1,183
2h 500bar 1sa	13,602
2h 500bar 2sa	6,120

4h 500bar 1sb	6,944
4h 500bar 2sb	1,944
2h 500bar 1sa	13,637
2h 500bar 2sa	7,486
2h 600bar 3sa	8,296
4h 600bar 3sb	3,507

sansa SOX HLET	4,885
sansa SFE 200bar 40°C 2h	19,232
sansa SFE 200bar 40°C 5h	6,398
sansa SFE 300bar 40°C 2h	10,342
sansa SFE 250bar 40°C 2h	9,470

Dai dati ottenuti è stato possibile identificare nelle estrazioni denominate 2SA-2SB e 3SA-3SB quelle sulle quali proseguire nella determinazione dell'attività biologica in vitro.

Attività antiossidante

Le cellule sono state trattate con le seguenti concentrazioni di estratto: 0,01%, 0,05 %, 0,1% in DMSO (al 20%).

La formazione dei ROS intracellulari è stata misurata cineticamente per un tempo di 120 minuti. usando come controllo cellule non trattate, i risultati anti- e pro-ossidanti sono stati valutati confrontando le pendenze ottenute dalle misurazioni cinetiche. I dati sono espressi come % rispetto al controllo considerato il 100%

Sanse 2SA-2SB:

Attività antiossidante in ECV 304

Le frazioni analizzate riducono dal 88% al 55% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo. Dopo stress ossidativo indotto dalla H₂O₂ le frazioni riducono dal 82 al 50 % la quantità di radicali liberi rispetto al controllo.

Attività antiossidante in HUVEC

Nelle Huvec le frazioni aumentano dal 130% al 174% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo che è il 100% mentre dopo stress ossidativo queste frazioni riducono dal 63% al 20% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo.

Attività antiproliferativa in ECV 304 e HUVEC

Anche per queste frazioni l'attività antiproliferativa è stata misurata con le stesse modalità del Lentisco. La proliferazione risulta ridotta del 75% rispetto al controllo solo alla concentrazione più alta per il 2SA. Nelle HUVEC la proliferazione risulta ridotta fino al 40% solo alla concentrazione più alta per il 2SA

Sanse 3SA-3SB:

Attività antiossidante in ECV 304

Queste frazioni riducono dal 88% al 55% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo. Dopo stress ossidativo le frazioni riducono dal 90% al 57% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo.

Attività antiossidante in HUVEC

Queste frazioni aumentano fino al 250% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo.

Dopo stress ossidativo solo la frazione 3SB riduce lievemente del 34 % la quantità di radicali liberi rispetto al controllo; le altre frazioni risultano simili al controllo o lievemente più alte

Attività antiproliferativa in ECV304 e HUVEC

Nelle ECV 304 si ha una riduzione della proliferazione del 70% circa alla concentrazione più alta sia per il 3SA che per il 3SB. Nelle HUVEC la riduzione va dal 20% al 50% circa alle concentrazioni più alte sia per il 3SA che per il 3SB.

La risposta biologica in vitro a suscitato l'interesse dei partecipanti al progetto. Il maggiore limite di questa matrice, riguarda l'eccessiva eterogeneità della stessa, derivando infatti dalla lavorazione di differenti *cultivars* di olive. Per tale motivo, le azioni sviluppate nel corso del progetto cluster, devono essere considerate

preliminari ad un progetto a carattere più ampio, che preveda l'estrazione da sanse ottenute da olive appartenenti a singole varietà.

Salvia desoleana

È stata raccolta presso un campo insistente nell'agro di Monti (SS), e subito trasportata presso Porto Conte Ricerche, per essere deumidificata.

Una volta raggiunta l'umidità ottimale, è stata aliquotata in sacchi di plastica sigillati sottovuoto e riposti in camera termostatica a 5 °C in attesa di essere sottoposta ad estrazione.

Le condizioni di estrazione presso l'impianto pilota sono state concordate con il Prof. Marongiu (Dipartimento Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Cagliari).

Vengono di seguito riportate le rese nelle differenti condizioni di estrazione, e le analisi in GC-MS dei maggiori composti chimici ritrovati.

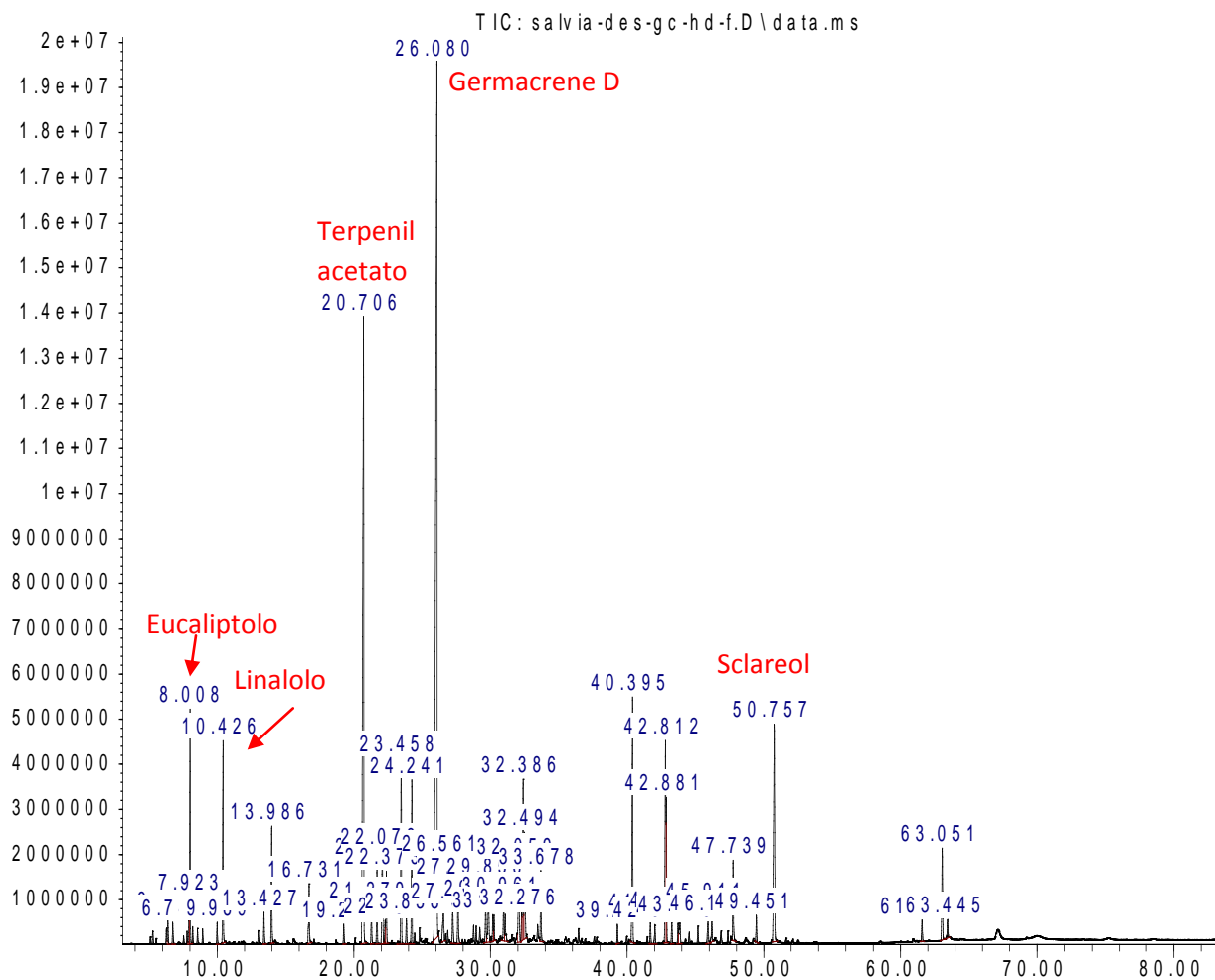


Salvia desoleana prima della deumidificazione

Campioni	Resa %
1. <i>Salvia desoleana</i> idrodistillato	0.13
2. <i>Salvia desoleana</i> estratto supercritico a 90 bar 50 °C 4 ore	0.6
3. <i>Salvia desoleana</i> estratto supercritico a 250 bar 40 °C 4 ore	0.9

1.Salvia desoleana idrodistillato

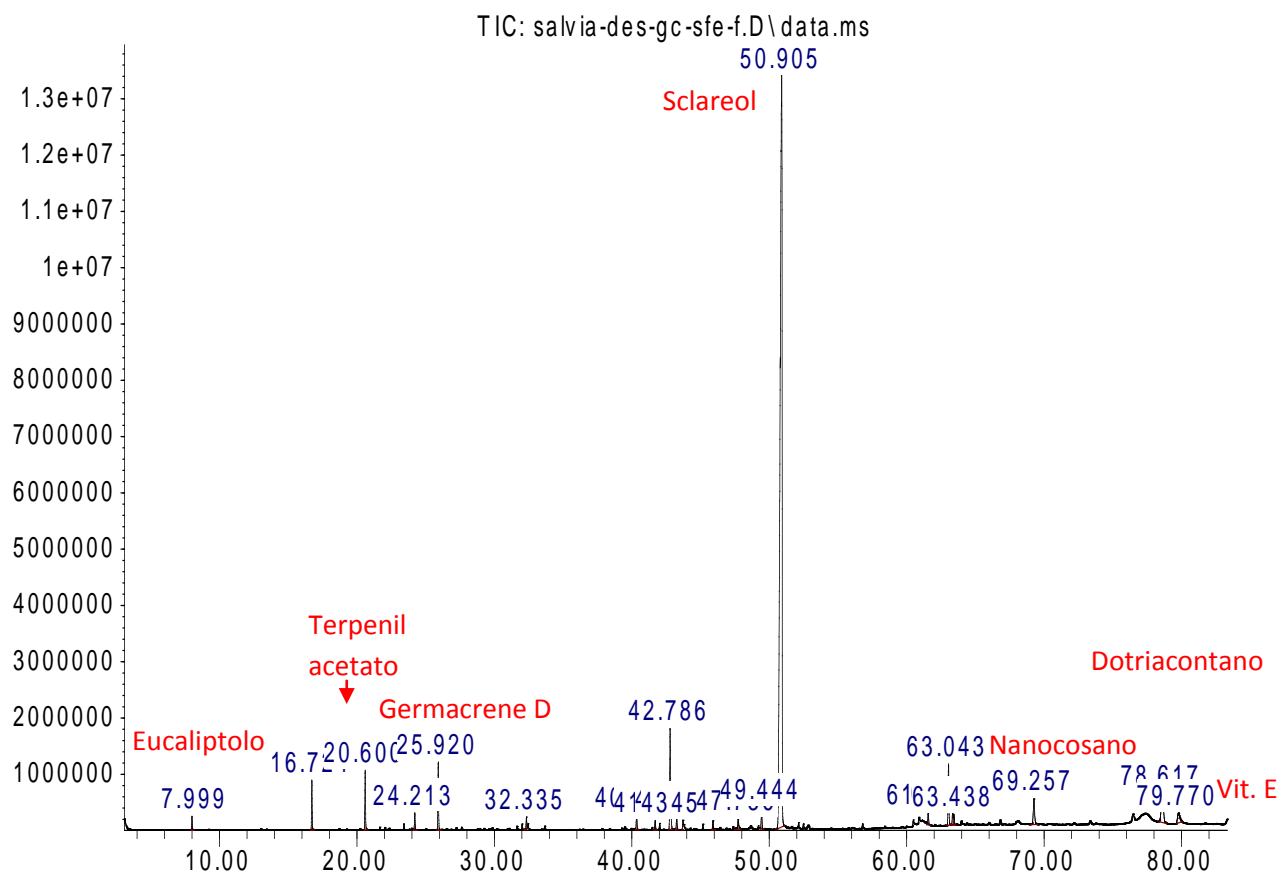
Abundance



Time-->

2. *Salvia desoleana* estratto supercritico a 90 bar

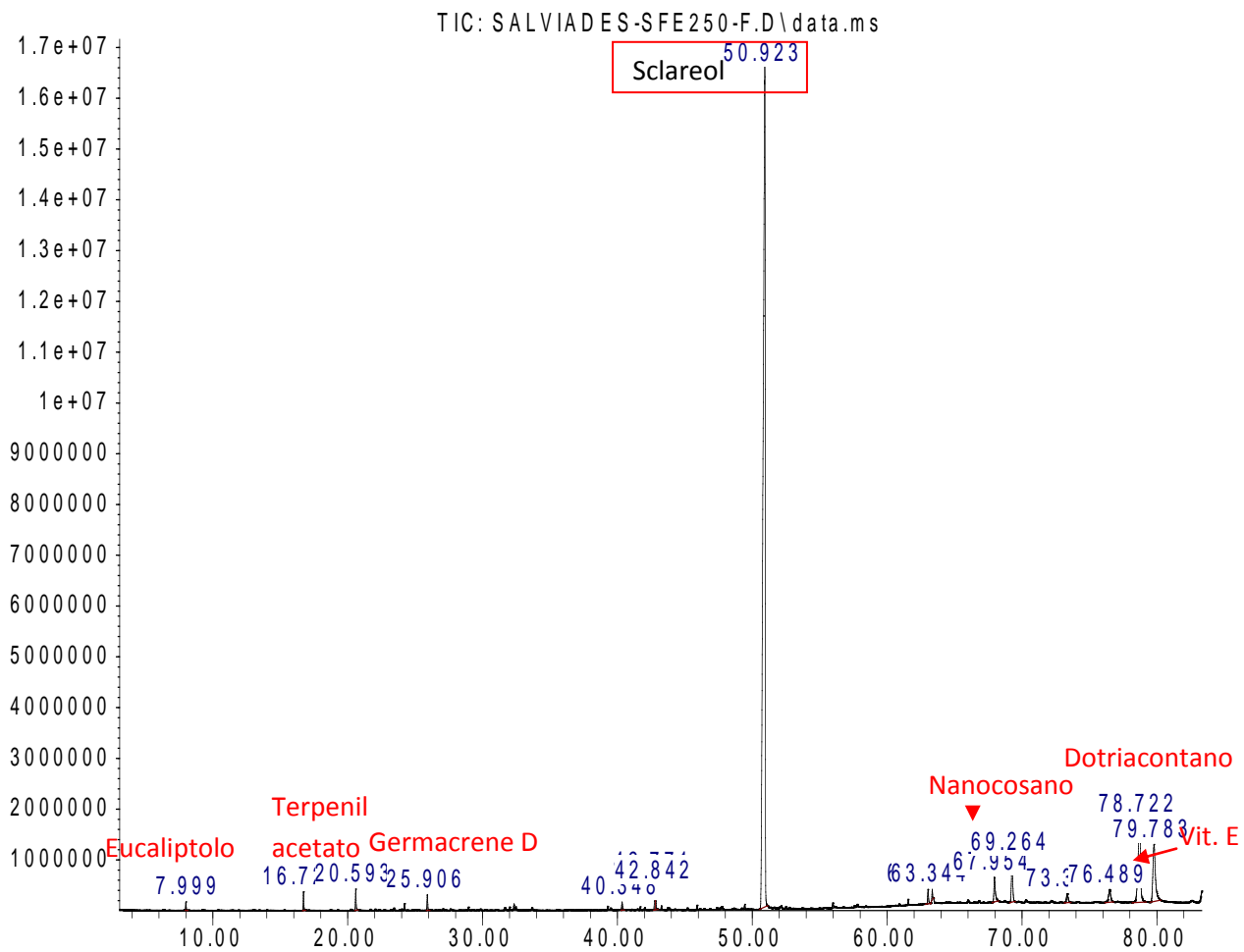
Abundance



Time-->

3. *Salvia desoleana* estratto supercritico a 250 bar

Abundance



Time-->

Tabella di confronto dei componenti principali nei vari estratti

Nome	RT (min)	HD	SFE 90 bar %	Area	SFE 250 bar
Eucaliptolo	8.0	3.1	0.4		0.2
Linalolo	10.43	2.9	-		-
Terpenil acetato	20.7	13.6	2.0		0.6
Germacrene D	26.1	26.5	2.4		0.5
Sclareol	50.9	5.0	74.6		75.4
Nonacosano C ₂₉ H ₆₀	69.3	-	1.7		2.4
Dotriacontano C ₃₂ H ₆₄	78.6	-	3.0		8.4
Vitamina E	79.7	-	1.1		5.9

dove:

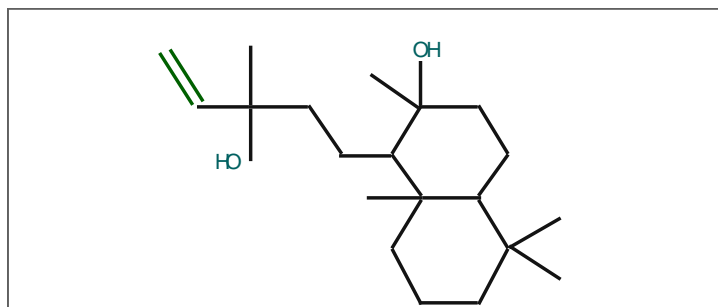
RT= Tempo di Ritenzione

HD= Estratto idrodistillato

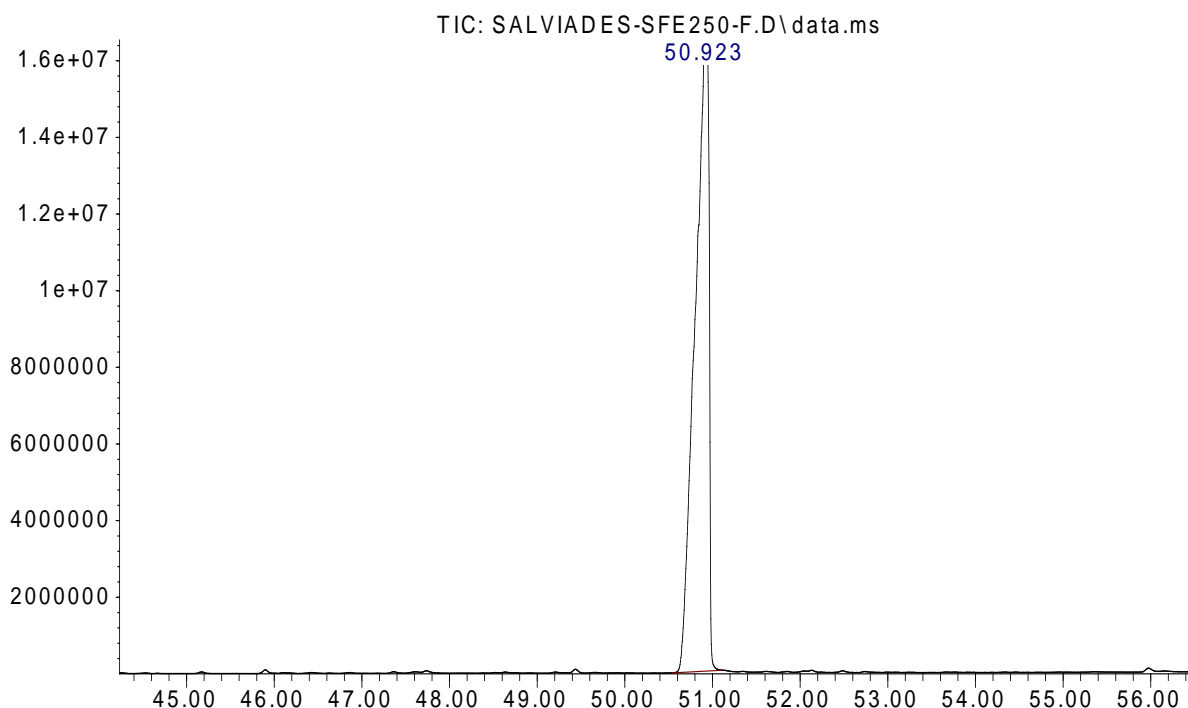
SFE 90 bar= estratto supercritico a 90 bar

SFE 250bar= estratto supercritico a 250bar

Sclareolo



Abundance



Time-->

L'obiettivo finale del progetto, prevede lo sfruttamento delle molecole al fine di ottenere preparati ad uso farmaceutico e/o alimentare. Da quanto esposto, è possibile concludere che la resa in termini di estratto non risulti coerente nell'ottica di tale obiettivo.

Attività antiossidante in ECV 304

L'estratto di salvia riduce del 33% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo solo alla concentrazione più alta. Dopo stress ossidativo la salvia riduce del 42% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo e solo alla concentrazione più alta.

Attività antiossidante in HUVEC

L'estratto di salvia riduce del 16% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo e solo alla più alta concentrazione. Dopo stress ossidativo la salvia riduce del 34% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo e solo alla più alta concentrazione.

Attività antiproliferativa in ECV304 in HUVEC

Non si osserva alcuna differenza significativa fra il controllo ed i trattati.

Conclusioni generali

Considerando i risultati relativi alla composizione degli estratti in termini di resa e di attività biologica in vitro, è possibile concludere che tale matrice non risponda ai requisiti generali del progetto

Probabilmente ciò è dovuto anche alle caratteristiche intrinseche della matrice con particolare riferimento ad una non ottimale concentrazione di olii essenziali negli estratti ottenuti.

Lentisco (*Pistacia lentiscus*)

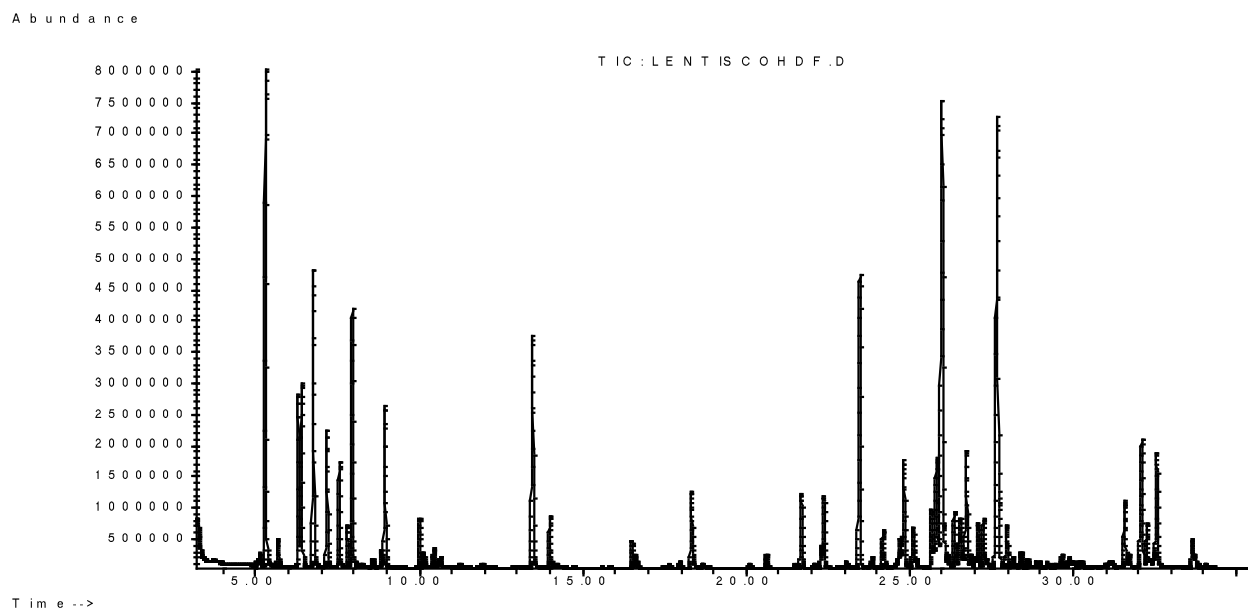
La matrice è stata conferita in foglie ed in bacche (a maturazione) dagli operatori della società “Consorzio Officinerbe Sardinia”.

La maturazione delle bacche si è verificata nel periodo tardo invernale (marzo 2009).

Entrambe le tipologie sono state sottoposte ad essiccazione fino al raggiungimento dell'umidità ottimale, aliquotata in sacchi di materiale plastico sigillato sotto vuoto, e stoccata in camera termostata in attesa della fase di estrazione degli olii essenziali.

Le analisi degli estratti sono stati ottenuti presso il laboratorio del Dipartimento Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Cagliari.

Condizioni di estrazione	Resa %
<i>Pistacia lentiscus</i> _estratto supercritico a 90 bar 50 °C 4 ore	0.8



% totale componenti rilevati	100
% totale componenti identificati	94.85
% totale comp. idrocarburici	78.49
% totale comp. ossigenati	14.51

% Classi		% Gruppi funzionali	
% totale MH	31.56	% totale alcoli (mono, di, tri)	13.66
% totale SH	46.27	% totale aldeidi	0
% totale MO	5.89	% totale chetoni	1.61
% totale SO	8.52	% totale eteri (mono..)	0
% totale DH	0	% totale epossidi	0.25
% totale DO	0	% totale esteri (compresi i lattoni)	0.67
% totale Pr-BH	0.65		
% totale Pr-BO	0.1		
% totale ALT	1.86		

Composizione olio essenziale SFE da foglie di lentisco

n.	RIK	Tr (min)	Compound	%
1	926	5.01	TRICYCLEN	0.096
2	931	5.11	ALPHA-THUJENE	0.219
3	938	5.29	ALPHA-PINENE	8.692
4	953	5.66	CAMPHENE	0.453
5	977	6.29	SABINENE	2.857
6	980	6.39	BETA-PINENE	3.025
7	993	6.76	MYRCENE	4.562
8	1007	7.17	ALPHA-PHELLANDRENE	2.170
9	1019	7.55	ALPHA-TERPINENE	1.661
10	1028	7.79	PARA-CYMENE	0.649
11	1032	7.95	BETA-PHELLANDRENE	4.332
12	1051	8.56	BETA(E)-OCIMENE	0.135
13	1059	8.83	ISOPENTIL N-BUTANOATE	0.245
14	1062	8.94	GAMMA-TERPINENE	2.533
15	1090	10.00	TERPINOLENE	0.830
16	1093	10.12	2-NONANONE	0.248
17	1101	10.43	LINALOOL	0.388
18	1107	10.63	ISOPENTYL ISOVALERATE	0.207
19	1180	13.47	TERPIN-4-OL	4.306
20	1191	13.98	ALPHA-TERPINEOL	0.874
21	1253	16.49	N.I.	0.440
22	1256	16.61	N.I.	0.218
23	1286	17.95	BORNYL ACETATE	0.118
24	1294	18.32	2-UNDECANONE	1.362
25	1302	18.65	N.I.	0.110
26	1351	20.61	ALPHA-CUBEBENE	0.262

n.	RIK	Tr (min)	Compound	%
27	1377	21.69	ALPHA-COPAENE	1.330
28	1390	22.29	BETA-CUBEBENE	0.353
29	1392	22.38	BETA-ELEMENE	1.288
30	1408	23.04	N.I.	0.138
31	1420	23.48	BETA-CARYOPHYLLENE	5.738
32	1429	23.85	BETA-GURJUNENE	0.213
33	1438	24.18	N.I.	0.746
34	1451	24.71	N.I.	0.759
35	1454	24.82	ALPHA-HUMULENE	2.097
36	1461	25.10	ALLO-AROMADENDRENE	0.907
37	1463	25.20	MUUROLA-4(14),5-DIENE<CIS>	0.198
38	1474	25.66	CADINA-1(6),4-DIENE<TRANS>	1.297
39	1478	25.82	GAMMA-MUUROLENE	2.610
40	1482	26.00	GERMACRENE-D	11.182
41	1486	26.15	BETA-SELINENE	0.279
42	1491	26.36	MUUROLA-4(15),5-DIENE<TRANS>	1.025
43	1495	26.55	ALPHA-SELINENE	1.507
44	1499	26.73	ALPHA-MUUROLENE	2.313
45	1503	26.88	N.I.	0.294
46	1506	26.99	N.I.	0.183
47	1509	27.09	BETA-BISABOLENE	0.924
48	1513	27.25	GAMMA-CADINENE	1.186
49	1525	27.68	DELTA-CADINENE	10.542
50	1533	27.97	TRANS-CADINA-1(2)-4-DIENE	0.791
51	1538	28.16	ALPHA-CADINENE	0.234
52	1544	28.40	N.I.	0.340
53	1550	28.61	ELEMOL	0.178
54	1556	28.86	N.I.	0.116
55	1559	28.98	ELEMICIN	0.100

n.	RIK	Tr (min)	Compound	%
56	1565	29.21	E-NEROLIDOL	0.117
57	1576	29.65	SPATUTENOL	0.248
58	1582	29.87	CARYOPHYLLENE OXIDE	0.251
59	1584	29.97	N.I.	0.155
60	1590	30.19	N.I.	0.052
61	1613	31.07	N.I.	0.104
62	1616	31.17	N.I.	0.158
63	1627	31.58	N.I.	1.247
64	1631	31.70	GAMMA-EUDESOL	0.236
65	1642	32.11	EPI-ALPHA-MUUROLOL	3.262
66	1646	32.25	ALPHA-MUUROLOL	0.828
67	1649	32.36	BETA-EUDESOL	0.121
68	1654	32.56	ALPHA-CADINOL	2.626
69	1683	33.64	EPI-ALPHA-BISABOLOL	0.506
70	1685	33.71	ALPHA-BISABOLOL	0.148
71	1694	34.05	N.I.	0.086

I risultati analitici sono risultati coerenti con quanto riportato in letteratura in termini di composti terpenici, che ne rappresentano la frazione ad attività antiossidante più importante. In accordo con tutti i partecipanti al progetto cluster si è pertanto deciso di verificarne le partecipanti potenzialità per l'utilizzo nelle industrie farmaceutiche ed alimentari, attraverso prove biologiche in vitro ed in vivo.

Attività antiossidante in ECV 304.

Così come riferito per gli estratti di sansa, le cellule sono state trattate con le seguenti concentrazioni di Lentisco: 0,01%, 0,05 %, 0,1% in DMSO (al 20%). La formazione dei ROS intracellulari è stata misurata cineticamente per un tempo di 120 minuti. usando come controllo cellule non trattate, i risultati anti- e pro-ossidanti sono stati valutati confrontando le pendenze ottenute dalle misurazioni cinetiche. I dati sono espressi come % rispetto al controllo considerato il 100%

Il trattamento delle ECV 304 con queste frazioni riducono del 70% al 45% la quantità dei radicali liberi rispetto al controllo. Dopo una esposizione delle cellule a stress ossidativo dovuto all'H₂O₂ il lentisco riduce dal 50% al 30 % la quantità dei radicali liberi rispetto al controllo.

Attività antiossidante in HUVEC

Le cellule sono state trattate con le stesse modalità delle ECV 304. Il trattamento delle HUVEC con queste frazioni riducono del 42% al 59% la quantità di radicali liberi rispetto al controllo. Dopo una esposizione delle cellule a stress ossidativo dovuto all' H_2O_2 queste frazioni riducono del 43% al 68 % la quantità di radicali liberi rispetto al controllo.

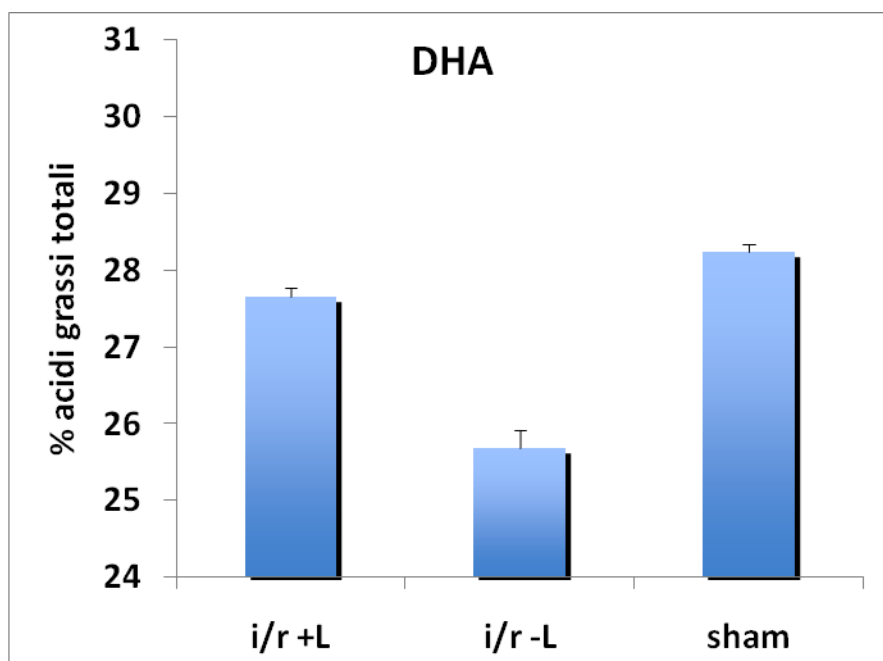
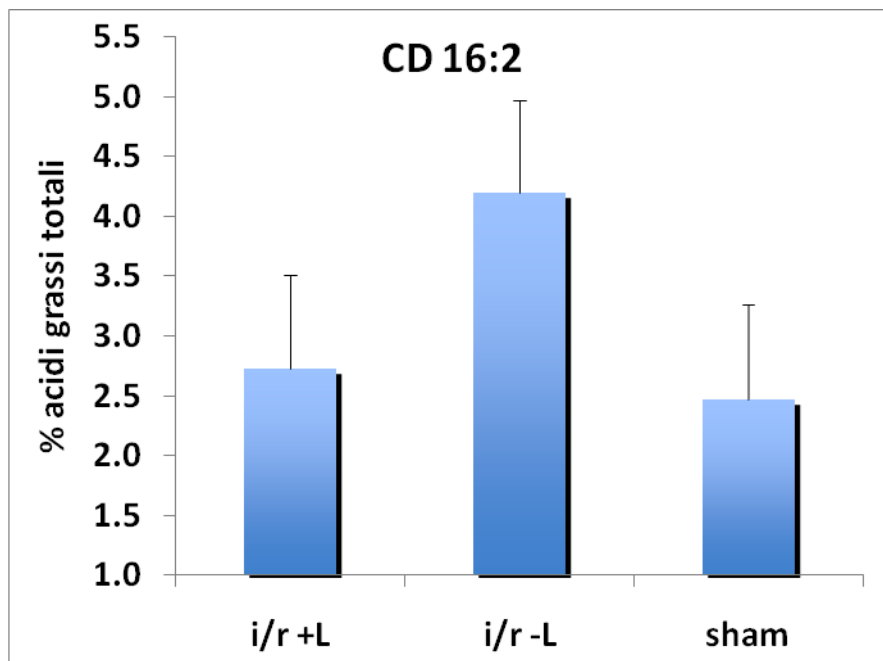
Attività antiproliferativa in ECV304 e HUVEC

Le cellule sono state trattate con le stesse concentrazioni di lentisco per 24 ore con lettura finale in fluorescenza. I dati sono espressi come % rispetto al controllo considerato il 100%. La misurazione della concentrazione del DNA mostra una riduzione del 60% alle concentrazioni più alte rispetto al controllo. Nel caso delle HUVEC la riduzione è circa il 30% alle concentrazioni più alte rispetto al controllo.

Attività biologica in vivo

È stata testata la capacità degli estratti di foglie di lentisco di prevenire eventuali danni da ischemia e ri-perfusione cerebrale in un modello sperimentale in vivo nel ratto dove l'ischemia e la conseguente ri-perfusione cerebrale, veniva praticata tramite occlusione temporanea delle carotidi bilaterali per 20 minuti. I ratti venivano sacrificati dopo 30 min di ri-perfusione (I/R-L). L'estratto di lentisco veniva somministrato (200mg) ai ratti 4h prima dell'occlusione via gavage (I/R+L). Come controllo sono stati impiegati sia ratti a cui si è praticata l'occlusione ma trattati solo con il veicolo, sia ratti che venivano operati ma senza praticare l'occlusione (sham). Sono state studiate diverse aree cerebrali, corteccia anteriore e posteriore, tubercolo olfattivo, ippocampo, striato, cervelletto e tronco encefalico.

I dati mostrano che il danno da ischemia e ri-perfusione non aumentava significativamente gli acidi grassi polinsaturi idroperossidi in nessuna delle aree. Aumentava invece un marker specifico della beta ossidazione perossisomiale, l'acido grasso esadecadienoico coniugato (CD16:2) che deriva dalla beta ossidazione del CLA nei perossisomi, ma solamente nella corteccia frontale (fig.1). In altri modelli sperimentali e nell'uomo è già stato dimostrato che un aumento della perossidazione lipidica determina un aumento della beta ossidazione perossisomiale indotta per catabolizzare i prodotti della perossidazione lipidica. Il trattamento con l'estratto di lentisco determinava invece un ritorno ai livelli del CD:16:2 simili a quelli del gruppo sham. Ciò sembra suggerire che durante l'ischemia e ri-perfusione la perossidazione lipidica è contrastata da un aumento della beta-ossidazione perossisomiale. E' probabile che la somministrazione dell'estratto prevenga la perossidazione lipidica e quindi anche la risposta fisiologica dell'aumento della beta ossidazione perossisomiale. A supporto di questa ipotesi è la diminuzione significativa, sempre nella corteccia frontale, nei ratti che hanno subito l'ischemia e ri-perfusione, del DHA, il più rappresentativo acido grasso polinsaturo in quest'area cerebrale e il più suscettibile all'ossidazione. Anche in questo caso, nei ratti pretrattati con l'estratto i livelli sono simili ai controlli (Fig.2).



DATI IMMUNOISTOCHEMICA

	CORTECCIA ANTERIORE				BULBO OLFATTIVO								
	A		B		A		B						
PLA2	+		++		+		++						
COX-2	+		++		+		++						
TRPV1	+		++		+		++						
Caspasi-3	+		++		+		++						
BDNF	+		++		+		++						
trkB	+		++		+		++						
GDNF	+		++		+		++						
GFRalfa-1	+		++		+		++						
PSA-NCAM	+		+		+		+						

A: I/R + L;

B: Sham

++: maggior densità/intensità di reazione.

Le osservazioni preliminari per stabilire eventuali differenze tra i ratti sottoposti ad ischemia bilaterale transitoria dell'arteria carotide comune mettono in evidenza che, per tutte o quasi le sostanze osservate, i ratti sham-operated presentano una maggiore immunoreattività in termini di intensità di colorazione specifica e densità di elementi nervosi marcati rispetto ai ratti I/R.

Analisi di WESTERN BLOT

	CORTECCIA ANTERIORE			
	A	B	C	D
PLA2	+	+	+	+
COX-2	+	++	++	++
BDNF	++	++	++	++
GDNF	+	+	+	+
Caspasi-3	+	+	+	+
GAPDH	+	+	+	+

	CERVELLETTO			
	A	B	C	D
PLA2	+	++	++	++
COX-2	nd	nd	nd	nd
BDNF	++	++	++	++
GDNF	+	+	+	+
Caspasi-3	nd	nd	nd	nd
GAPDH	+	+	+	+

A: I/R+L;

B: I/R-L;

C: Sham +L

D: Sham-L

++: intensità maggiore

Il dato più interessante per quanto riguarda le analisi di western blot, è la diminuzione di COX-2 nella corteccia anteriore, in accordo con un'azione da parte dell'estratto sull'ossidazione del DHA e quindi una diminuita induzione del processo infiammatorio di cui la COX-2 è uno degli attori principali.

Elicriso (*Helicrisum spp*)



La scelta di questa matrice si è resa necessaria per l'impossibilità di reperire un quantitativo sufficiente di Timo (erba barona) precedentemente indicata come una delle matrici da analizzare.

Il campo da cui è stata effettuata la raccolta, è stato individuato su segnalazione del responsabile del "Consorzio Officinerbe Sardinia" in località Tottubella (SS).

Anche questa matrice dopo essere stata sottoposta al trattamento per la riduzione dell'umidità, è stata conservata in cella termostata.

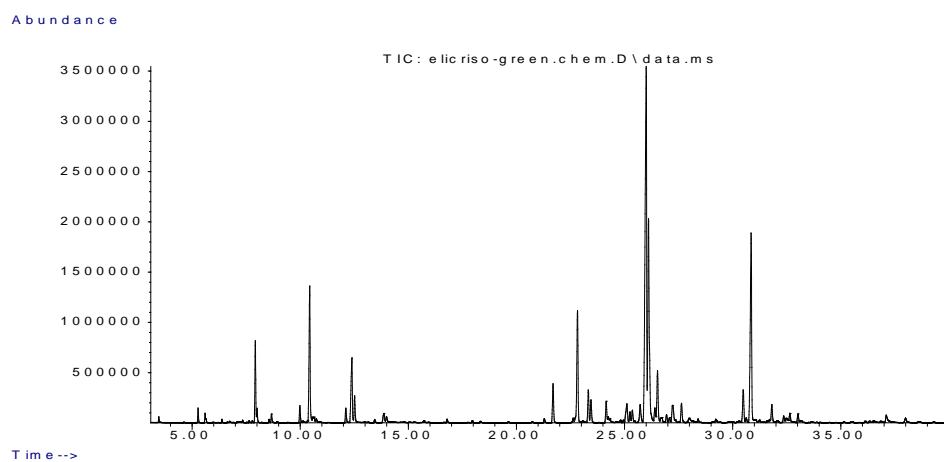
In seguito, è stata aliquotata in sacchi plastici sottovuoto e stoccata in camera termostata a 5 °C, prima di essere sottoposta ad estrazione. Al pari delle altre matrici, le condizioni estrattive sono state concordate con il Prof. Bruno Marongiu (Dipartimento Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Cagliari). Tali condizioni e la relativa resa in olio essenziale sono riportate in tabella.

Condizioni di estrazione	Resa %
<i>Helicrisum spp.</i> estratto supercritico a 90 bar 50 °C 4 ore	0.19

Condizioni di estrazione su scala di laboratorio Dipartimento di Scienze Chimiche

Pressione di estrazione, bar	90
Temperatura di estrazione, °C	40
Pressione primo separatore, bar	90
Temperatura primo separatore, °C	-10
Pressione secondo separatore, bar	20
Temperatura secondo separatore, °C	25
Portata del solvente (Kg/h)	1.5

Caratterizzazione chimica: olio essenziale



n.	I _k	Tr (min)	Composto	SFE
1	841	3.460	4-methylhexan-3-one	0.2
2	938	5.279	alpha-pinene	0.5
3	951	5.600	alpha-fenchene	0.2
4	1032	7.927	limonene	3.2
5	1034	8.005	1,8-cineole	0.6
6	1054	8.673	isobuthyl angelate	0.4
7	1090	9.985	fenchone	0.8
8	1101	10.441	linalool	6.9
9	1147	12.109	camphor	0.7
10	1154	12.394	n.i.	4.1
11	1157	12.519	n.i.	1.3
12	1188	13.871	n.i.	0.6
13	1191	13.990	alpha-terpineol	0.3
14	1377	21.696	2-epi-alpha-funebrene	2.1
15	1402	22.826	italicene	6.7
16	1415	23.324	alpha-cis-bergamotene	1.7
17	1419	23.448	beta-caryophyllene	1.3
18	1437	24.153	alpha-trans-bergamotene	0.9
19	1461	25.106	allo-aromadendrene	1.4

20	1464	25.251	alpha-acoradiene	0.5
21	1467	25.365	beta-acoradiene	0.6
22	1476	25.723	beta-chamigrene	1.2
23	1482	26.003	gamma-curcumene	26.3
24	1485	26.112	alpha-curcumene	13.9
25	1492	26.402	phenil ethyl 3-methyl butanoate	0.8
26	1495	26.526	alpha-selinene	2.9
27	1505	26.941	alpha-cuprenene	0.4
28	1513	27.221	beta-curcumene	1.2
29	1524	27.635	delta-cadinene	1.2
30	1597	30.491	guaiol	2.0
31	1607	30.853	rosifoliol	12.2
32	1634	31.812	n.i.	1.0
33	1649	32.362	beta-eudesmol	0.4
34	1657	32.647	valerianol	0.5
35	1667	33.020	bulnesol	0.4
36	1781	37.103	n.i.	0.6

Conclusioni generali

Pur evidenziando la presenza di composti di sicuro interesse, la resa di tale matrice (0.19%) ha portato i partecipanti al cluster, ad escluderla dalle seguenti fasi per l'ottenimento di preparati farmaceutici e/o alimentari.

Considerazioni finali

Stante la stagionalità delle matrici prescelte, e la loro notevole eterogeneità costitutiva, è stato necessario attuare strategie analitiche differenti, in tempi molto diversi tra loro. Tale situazione ha determinato un certo scollamento tra le diverse attività previste dal progetto.

Tuttavia l'utilizzo in prove in vivo degli estratti di foglie di lentisco, mette in evidenza come che l'ischemia e riperfusione praticata tramite occlusione temporanea delle carotidi bilaterali, induce a livello della corteccia anteriore l'ossidazione del DHA ed una risposta fisiologica atta alla degradazione dei prodotti di ossidazione tramite la beta ossidazione perossisomiale. La somministrazione dell'estratto di lentisco, sembra proteggere il DHA dall'ossidazione rendendo non necessario l'aumento della beta ossidazione perossisomiale e riducendo la disponibilità della COX-2. Ulteriori studi con diverse concentrazioni dell'estratto e con le molecole pure presenti nell'estratto dovrebbero essere condotti per confermare questi dati.

Il modello sperimentale impiegato è un ottimo modello di sofferenza cerebrale nell'uomo indotta dalla parziale occlusione bilaterale delle arterie carotidee, che si riscontra comunemente in pazienti affetti da aterosclerosi. Se questi dati si confermassero, l'impiego degli estratti di lentisco in questi pazienti, potrebbe almeno in parte proteggere dal danno ossidativo ed infiammatorio cerebrale e dalla parziale deplezione di DHA, acido grasso essenziale del tessuto nervoso.

In particolare, l'obiettivo finale prevede la veicolazione delle molecole attive in opercoli (capsula rigida) e/o compresse, necessita da una conoscenza puntuale, che parte dalla scelta della matrice, dai suoi composti più importanti e dalla risposta all'attività biologica in vitro, prima di poter procedere all'analisi in vivo.

Allo stato attuale, ed in seguito ad un confronto con tutti i partecipanti attivi al progetto, la matrice che pare aver dato le migliori risposte, sia dal punto di vista costitutivo che per l'attività biologica, sono gli estratti provenienti dalle foglie di *Pistacia lentiscus* per le quali si è convenuto fosse importante valutare la risposta biologica anche in vivo. I dati ottenuti saranno oggetto di una valutazione approfondita da parte delle aziende partecipanti al cluster interessate alla produzione dei formulati farmaceutici in un futuro prossimo.

Bibliografia Vinacce

Manuel Pinelo, Anis Arnous and Anne S. Meyer (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology* 17 579-590.

Manuel Pazos, Jose' Manuel Gallardo, Josep Lluís Torres, Isabel Medina. (2005) Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry* 92 547–557.

Tunde Vatai, Mojca Skerget, Zeljko Knez, Sabine Kareth, Manuel Wehowski, Eckhard Weidner (2008). Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. *J. of Supercritical Fluids* 45 32–36.

O. Muñoz, M. Sepulveda, M. Schwartz (2004). Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from chilean wine. *Food Chemistry* 87 487–490.

Andrea Versari, Roger B. Boulton, Giuseppina P. Parpinello (2008). A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. *Food Chemistry* 106 397–402.

Alberto Davalos, Begona Bartolome, Carmen Gomez-Cordoves (2005). Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry* 93 325–330.

Giorgia Spigno, Lorenza Tramelli, Dante Marco De Faveri (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics *Journal of Food Engineering* 81 200–208.

V. Amico, E.M. Napoli, A. Renda, G. Rubertoì, C. Spatafora, C. Tringali (2004). Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar 'Nerello Mascalese'. *Food Chemistry* 88 599–607

Antonia Llobera, Jaime Canellas (2007). Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry* 101 659–666.

M. Palma, L.T. Taylorb (1999) Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*, 849 117–124.

- V. Núñez, M. Monagas, M.C. Gomez-Cordovés, B. Bartolomé (2004). *Vitis vinifera* L. cv. *Graciano* grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology and Technology* 31 69–79.
- F. Bonilla, M. Mayen, J. Merida, M. Medina (1999). Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry* 66 209-215.
- M. José Gómez-Míguez, Manuela Gómez-Míguez, Isabel M. Vicario, Francisco J. Heredia (2007). Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: Effects of grape maturity and soil type. *Journal of Food Engineering* 79 758–764.
- C. Perez-Lamela, M.S. Garcia-Falcon, J. Simal-Gandara, I. Orriols-Fernandez (2007). Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chemistry* 101 601–606.
- Margarita Corrales, Peter Butz, Bernhard Tauscher (2005). Recovery of anthocyanins and polar antioxidants from Dornfelder grape pomace (*Vitis vinifera* spp.) with high-hydrostatic pressure. *J. Food Eng.*, 45, 25-31.
- Silvia Perez-Magarino,¹ Ma Luisa Gonzalez-San Jose (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry* 96 197–208.
- E. Arslan, M.E. Yener, A. Esin (2005). Rheological characterization of tahin/pekmez (sesame paste/concentrated grape juice) blends. *Journal of Food Engineering* 69 167–172.
- Pooja Doshi, Pandurang Adsule & Kaushik Banerjee (2006). Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera* L.) cv. *Kishmish Chorny* (Sharad Seedless) during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 41 (Supplement 1), 1–9.
- Sofia Macedo, Susana Fernandes, José A. Lopes, Hermínio C. de Sousa, Paulo J. Pereira, Paulo J. Carmelo, Carlos Menduiña, Pedro C. Simões, Manuel Nunes da Ponte (2008). Recovery of Wine-Must Aroma Compounds by Supercritical CO₂. *Food Bioprocess Technol* 1:74–81.
- Giuseppe Ruberto, Agatino Renda, Carmelo Daquino, Vincenzo Amico, Carmela Spatafora, Corrado Tringali, Nunziatina De Tommasi (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry* 100 203–210.

I. Revilla, S. Perez-Magarino, M.L. Gonzalez-SanJose, S. Beltran (1999). Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 847 83–90.

Borislav Milievi¹, Mara Banovi, Karin Kovaevi-Gani and Leo Gracin(2002). Impact of Grape Varieties on Wine Distillates Flavour. *Food Technol. Biotechnol.* 40 (3) 227–232

Eugenio Revilla, Jose Maria Ryan(2000). Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography*, 881 461–469.

Bibliografia *Pistacia lentiscus*

Sandro Pignatti Flora d'Italia Edagricole (1997)

Patricio Garia-Fayos, Miguel Verdù (1998). Soil seed bank, factors controlling germination and establishment of a Mediterranean shrub: *Pistacia lentiscus* L. *Acta Oecologica* 19 357 – 356.

Aldo Domenico Atzei Le piante nella tradizione popolare della Sardegna
Carlo Delfino Editore.

Sana Janakat, Hela Al-Merie (2002) Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca* *Journal of Ethnopharmacology* 83 135 – 138.

Predrag Ljubuncic, Hui Songa, Uri Cogan, Hassan Azaizeh, Arie Bomzon (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology* 100 198–204.

Chrysoula C. Tassou & G. J. E. Nychas (1995). Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Mastic Gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram Positive and Gram Negative Bacteria in Broth and in Model Food System. *International Biodeterioration & Biodegradation* 411-420.

Andrea Barra, Valentina Coroneo, Sandro Dessì, Paolo Cabras, Alberto Angioni (2007). Characterization of the volatile Constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 7093-7098.

M.E. Durua, A. Cakirb, S. Kordalic, H. Zenginc, M. Harmandara, S. Izumid, T. Hiratad (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia* 74 170–176.

Gardeli Chryssavgi, Papageorgiou Vassiliki, Mallouchos Athanasios, Theodosis Kibouris, Komaitis Michael (2008) Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry* 107 1120–1130.

Vincent Castola, Ange Bighelli, Joseph Casanova (2000). Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology* 28 79 – 88.

El-Hadi Benyoussef, Stoyka Charchari, Nazli Nacer-Bey, Nabila Yahiaoui, Abdeslam Chakou, Mohammed Bellatreche(2005) The essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research* 17 642-644.

Raffaele Congiu, Danilo Falconieri, Bruno Marongiu, Alessandra Piras, Silvia Porcedda (2002). Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L essential oil by supercritical CO₂. *Flavour and Fragrance Journal* 17 239-244.

BIBLIOGRAFIA SANSA

R. Borja, E. Sanchez, F. Raposo, B. Rincon, A.M. Jimenez , A. Martin. (2006) *Waste Management* 26 477–486
A study of the natural biodegradation of two-phase olive mill solid waste during its storage in an evaporation pond.

Fahrettin Gogus , Medeni Maskan (2006) Air drying characteristics of solid waste (pomace) of olive oil processing. *Journal of Food Engineering* 72 378–382

Roig M.L. Cayuela, M.A. Sanchez-Monedero. (2006) An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* 26 960–969

T.H. Erguder, E. Gu'ven, G.N. Demirer (2000) Anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors. *Process Biochemistry* 36 243–248.

A.I. Martin Garcia, A. Moumen, D.R. Yáñez Ruiz, E. Molina Alcaide (2003) Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves. *Animal Feed Science and Technology* 107 61–74

Özlem Güçlü-Üstündag, Feral Temelli (2004) Correlating the solubility behavior of minor lipid components in supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids* 31 235–253.

Tiziana Fornari, Luis Vázquez, Carlos F. Torres, Elena Ibanez, Francisco J. Senorans, Guillermo Reglero (2008). Countercurrent supercritical fluid extraction of different lipid-type materials: Experimental and thermodynamic modeling. *J. of Supercritical Fluids* 45 206–212.

Erbil Kalmis, Sayit Sargin International (2004) Cultivation of two *Pleurotus* species on wheat straw substrates containing olive mill waste water. *Biodeterioration & Biodegradation* 53 43 – 47.

Hai-Tao Lu, Yue Jiang, Feng Chen (2004). Determination of Squalene Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *Cromatographia*, 59, 367–371.

Annalisa Rotondi, Alessandra Bendini, Lorenzo Cerretani, Matteo Mari, Giovanni Llercker, Tullia Gallina Toschi. (2004). Effect of Olive Ripening Degree on the Oxidative Stability and Organoleptic Properties of Cv. Nostrana di Brisighella Extra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3649-3654.

O.J. Catchpole, J.B. Grey, K.A. Noermark (2000). Fractionation of fish oils using supercritical CO₂ and CO₂+ethanol mixtures. *Journal of Supercritical Fluids* 19 25–37.

R.W. Owen, R. Haubner, W. Mierb, A. Giacosa, W.E. Hulld, B. Spiegelhalder, H. Bartsch (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology* 41 703–717.

Kellie L. Tuck, Peter J. Hayball (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 636–644.

Sergio Acina, Maria A. Navarro, Javier S. Peronac, Jose' M. Arbones-Mainara, Joaquin C. Surra, Mario A. Guzman, Ricardo Carnicera, Carmen Arnal, Israel Ormand, Jose C. Segoviad, Jesus Osada, Valentina Ruiz-Gutierrez (2007). Olive oil preparation determines the atherosclerotic protection in apolipoprotein E knockout mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18 418– 424.

Rui Ruivo, Alexandre Paiva, Pedro Simões (2004). Phase equilibria of the ternary system methyloleate/squalene/carbon dioxide at high pressure conditions. *J. of Supercritical Fluids* 29 77–85.

R. W. Owen, W. Mier, A. Giacosa, W. E. Hull, B. Spioegelhalder and H. Bartsh (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology* 38 647-659.

Adamantini Paraskevopoulou, Dimitrios Boskou, Vassilis Kiosseoglou (2005). Stabilization of olive oil – lemon juice emulsion with polysaccharides. *Food Chemistry* 90 627–634.

Antonella De Leonardis, Vincenzo Macciola, Giuseppe Lembo, Alessandra Aretini b, Ahindra Nag (2007). Studies on oxidative stabilisation of lard by natural antioxidants recovered from olive-oil mill wastewater. *Food Chemistry* 100 998–1004.

A. de Lucas, E. Martinez de la Ossa, J. Rincon, M.A. Blanco, I. Gracia (2002). Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *Journal of Supercritical Fluids* 22 221–228

R. Arjona, A. Garcoa, P. Ollero. (1999) The drying of alpeorujo, a waste product of the olive oil mill industry. *Journal of Food Engineering* 41 229-234.

Yolanda Aguilera, Manuel E. Dorado, Francisco A. Prada, Juan J. Martinez, Adela Quesada, Valentina Ruiz-Gutierrez (2005). The protective role of squalene in alcohol damage in the chick embryo retina. *Experimental Eye Research* 80 535–543.

BIBLIOGRAFIA TIMO ERBA-BARONA

Manlio Chiappini Guida alla flora pratica della Sardegna Carlo Delfino editore (1988).

S. Cosentino, C.I.G. Tuberose, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi, F. Palmas (2002). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29-2 130-135.

Mario D.L. Moretti, Giovanni Sanna-Passino, Stefania Demontis, Emanuela Bazzoni (2002) Essential Oil Formulations Useful as a New Tool for Insect Pest Control. *AAPS PharmSciTech* 3 (2).

Marianna Usai, Aldo Atzei, Giorgio Pintore, Ioseph Casanova(2002) Composition and variability of the essential oil of Sardinian Thymus Herba-barona Loisel. *Flavour and Fragrance Journal* 18 21-25

Aldo Domenico Atzei Le piante nella tradizione popolare della Sardegna

Carlo Delfino Editore.

BIBLIOGRAFIA *Salvia desoleana*

- 1) Camarda Ignazio; Valsecchi Franca. Piccoli arbusti liane e suffrutici spontanei della Sardegna. Sassari, Carlo Delfino Editore, 1990.
- 2) Ayhan Ulubelen (2003). Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry* 64 395–399.
- 3) G. Miliauskasa, P.R. Venskutonisa, T.A. van Beekb (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85 231–237.
- 4) Ilkay Orhan, Murat Kartal, Qamar Naz, Asma Ejaz, Gulderen Yilmaz , Yuksel Kan, Belma Konuklugil, Bilge Sener, M. Iqbal Choudhary (2007). Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry* 103 1247–1254.
- 5) Ł. Kuzma, M. Rozalskib, E. Walenckac, B. Rozalskac, H. Wysokinska(2007) Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci. *Phytomedicine* 14 31–35.
- 6) Murgia S.D. (aa. 1995-1996) Contributo allo studio della medicina popolare in Sardegna: inchiesta a Nurallao. Tesi di Laurea.